

**Charakterisierung von Silber-Nanopartikeln mit der  
Feldflussfraktionierung, Hochdruckflüssigkeitschromatographie  
und der induktiv gekoppelten Plasma-Massenspektrometrie**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

Spezialisierung: Angewandte Analytik und Umweltchemie

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

M. Sc. Carina Anna Sötebier

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Elmar Kulke

---

Gutachter/innen:           1. Prof. Dr. Ulrich Panne  
                                     2. Prof. Dr. Klaus Rademann  
                                     3. Prof. Dr. Jörg Bettmer

Tag der mündlichen Prüfung: 27.03.2017



*In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern,  
die am Rande des Wissens hie und da einen Kiesel aufheben,  
während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.*

Isaac Newton





## Danksagung

Die vorliegende Doktorarbeit wurde im Zeitraum vom 01. Februar 2011 bis zum 31. Juli 2016 in den Fachbereichen 1.3 Strukturanalytik und 1.1 Anorganische Spurenanalytik an der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung im Rahmen einer Promotion an der Humboldt-Universität zu Berlin durchgeführt.

Ich habe mich an der BAM sehr wohl gefühlt und habe die Entscheidung, extra für die Doktorarbeit nach Berlin gezogen zu sein, nie bereut. Das lag an der großartigen Betreuung durch Dr. Steffen Weidner, Dr. Norbert Jakubowski und Prof. Dr. Ulrich Panne, wie auch an der tollen, kollegialen Atmosphäre an der BAM. Ich habe mich immer ernstgenommen, unterstützt und sehr wohl an der BAM gefühlt. Zudem habe ich sehr genossen, dass es in Adlershof einen hohen Anteil an Doktoranden gibt, und habe in einigen von ihnen gute Freunde gefunden.

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. U. Panne, der die Stelle für diese Doktorarbeit für mich geschaffen hat. Er hat mir das spannende Thema übertragen und mich dabei mit hohem Interesse, tollen fachlichen Diskussionen sowie der Ermöglichung der Zusammenarbeit mit Prof. Jörg Bettmer von der Universität Oviedo großartig unterstützt.

Einen großen Anteil zum Gelingen dieser Doktorarbeit hat Dr. Steffen Weidner durch seine Betreuung, große Hilfsbereitschaft und die immer offene Tür für Diskussionen beigetragen. Dr. Norbert Jakubowski danke ich für den vielseitigen Input, die Unterstützung und die vielen fachlichen Gespräche, die diese Arbeit sehr voran gebracht haben. Ein großes Dankeschön geht an Prof. Jörg Bettmer für die Möglichkeit, drei Monate im Labor mit ihm zusammenarbeiten und dabei viel von ihm zu lernen zu dürfen sowie für die großartige Unterstützung und die vielen Gespräche. Meiner Fachbereichsleiterin Frau Dr. Franziska Emmerling gilt mein Dank für die immer offene Tür und die Unterstützung.

Danken möchte ich auch meinen Bürokollegen, Anke Kabelitz und Hannes Kulla sowie den Doktoranden Lisa Batzdorf, Maike Joester und Nicolai Zientek für die vielen fachbezogenen Diskussionen. Ein kurzes Gespräch oder ein Stück Schokolade hat mich bei größeren Herausforderungen für einen Moment abgelenkt und mir neue Energie gespendet.

Der Polymer-Gruppe mit Dr. Steffen Weidner, Dr. Jana Falkenhagen, Rosemarie Laging, Franziska Rudolph, Karin Böttcher, Maria Baumann, Ruben Epping, Franziska Lauer, Zengchao You und Philipp Scholz gilt ein ganz besonderer Dank! Ich habe die tolle Atmosphäre sehr wertgeschätzt und werde die Zeit bei euch vermissen. Dr. Jana Falkenhagen danke ich zudem für die unerlässliche Unterstützung zur Aufklärung des HPLC-Mechanismus und den ausgeliehenen Roman, für dessen Lesen ich nie richtig Zeit hatte. Franziska Rudolph verdient

meinen Dank für die Einführung in die AF4, ihr offenes Ohr sowie die Begeisterung, diverse FFF-Pumpen etc. mit mir zusammen aufzuschrauben.

Weiterhin danke ich Antje Cossmer und Benita Schmidt für die tolle Zusammenarbeit und vielen Diskussionen. Andreas Schulz gilt mein Dank für die vielen Tipps zum noch sauberen Arbeiten und das Basteln von Schlauchkonstruktionen für den internen Standard. Ralf Bienert unterstützte diese Arbeit mit Gesprächen über u.a. Nanopartikeldefinitionen und komplexe Proben. Mein Dank gilt auch Frau Tietz und Frau Kluge für die administrative Unterstützung und Carsten Prinz und Anka Kohl für die Hilfsbereitschaft bei diversen PC-Belangen.

Frank Bierkandt danke ich für die tolle Zusammenarbeit bezüglich der LA-ICP-MS-Messungen und die Begeisterungsfähigkeit, als ich die Idee hatte, AF4-Membranen zu ablatieren, mit welcher er einen großen Teil zu ersten Veröffentlichung während dieser Arbeit beigetragen hat. Weiterhin danke ich Dominik Lubjuhn für die DLS-Messungen, Steffi Rades für die TSEM-Messungen und Maria Richter für die Fluoreszenz-Messungen sowie den gesamten Fachbereichen 1.1 und 1.3.

Für die Unterstützung, das Verständnis in stressigen Phasen und die nötige Ablenkung sowohl in dem Studium wie auch der Promotionszeit möchte ich mich sehr herzlich bei meinem Freund Simon, welcher mich ebenfalls bei dem Zeichnen der Graphiken im Theorie-Teil unterstützt hat, meinen Freunden, meiner Schwester und meinen Eltern bedanken.

## Kurzzusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier verschiedene Methoden zur Separation, Identifikation sowie Quantifizierung von Silber-Nanopartikeln (Ag-NP) entwickelt. Mittels asymmetrischer Fluss-Feldflussfraktionierung (AF4) in Kombination mit einem induktiv gekoppelten Plasma-Massenspektrometer (ICP-MS) konnten eine gute Trennung und hohe Wiederfindungsraten gefunden werden. Eine systematische Studie möglicher Probenverluste während der Methodenoptimierung zeigte, dass der größte Verlust durch die  $\text{Ag}^+$ -Ionen verursacht wurde, während Verluste durch Ablagerungen auf der Membran vernachlässigbar waren. Für Citrat-stabilisierte Ag-NP konnten mittels Hohl-faser-Fluss-Feldflussfraktionierung (HF5) gute Trennergebnisse erreicht und der hydrodynamische Durchmesser bestimmt werden. Zur Bestimmung der Partikelanzahlgrößenverteilung und des geometrischen Durchmessers von Partikeln in unbekannter Matrix wurde die Isotopenverdünnungsanalyse (IVA) erfolgreich mit der Einzelpartikel ICP-MS kombiniert. Weiterhin wurde eine Hochdruckflüssigkeitschromatographie(HPLC)-IVA-ICP-MS-Methode entwickelt, mit welcher NP und ihre korrespondierenden Ionen getrennt und quantifiziert werden konnten. Ein Vergleich der Ansätze zeigt, dass eine Kombination mehrerer Methoden nötig ist, um alle relevanten Informationen über die NP zu erhalten. Zum Abschluss wurde mit den entwickelten Methoden das Umweltverhalten der Ag-NP in einer Huminsäure(HS)-Suspension untersucht. Hierbei wurden erste Stabilisierungseffekte in Bezug auf die Ag-Konzentration und Partikelanzahl festgestellt. Zudem konnte mittels HF5 und HPLC für kleine NP in HA eine Modifikation in Form der Ausbildung eines zweiten, kleineren NP-Signals beobachtet werden.

## Abstract

In this work, four different methods for the separation, identification, and quantification of silver nanoparticles (Ag-NP) were developed. Using asymmetric flow field-flow fractionation (AF4) in combination with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), a good separation and high recovery rates were found. A systematic investigation of possible sample losses during the method optimization showed that  $\text{Ag}^+$  ions caused the highest loss and only negligible amounts of Ag residues on the membrane were found. For citrate-stabilized Ag-NP, hollow fiber flow-field flow fractionation (HF5) analyses achieved good results for the separation and calculation of the hydrodynamic diameters. In order to determine the particle number size distribution and the geometric diameter for samples in unknown matrices, isotope dilution analysis (IVA) was successfully combined with single particle ICP-MS. Additionally, a high-performance liquid chromatography (HPLC)-IVA-ICP-MS approach was developed, which was able to separate and quantify NP and their corresponding ions. A comparison of the methods showed that a combination of different approaches is necessary to obtain all relevant information. Finally, the methods were applied to analyze the environmental behavior of Ag-NP in a humic acid (HS) suspension. Here, first stabilization effects in terms of the Ag concentration and particle number concentration were detected. Using HF5 and HPLC for the analysis of small NPs in HS, a modification in the form of a second, smaller NP signal was observed.

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	XIII
1 Einleitung .....	1
2 Aufgabenstellung .....	4
3 Theoretische Grundlagen.....	5
3.1 Charakteristische Größen von Nanopartikeln .....	5
3.1.1 Der hydrodynamische Durchmesser .....	5
3.1.2 Stabilisierung und das Zetapotential .....	7
3.2 Silber-Nanopartikel .....	9
3.3 Huminstoffe .....	11
3.4 Trennverfahren .....	13
3.4.1 Feldflussfraktionierung .....	13
3.4.1.1 Das Trennprinzip .....	13
3.4.1.2 Asymmetrische Fluss-Feldflussfraktionierung (AF4) .....	14
3.4.1.3 Hohlfaser-Fluss-Feldflussfraktionierung .....	18
3.4.2 Hochdruckflüssigkeitschromatographie.....	19
3.4.2.1 Größenausschlusschromatographie .....	20
3.4.2.2 Umkehrphasenchromatographie .....	21
3.5 Massenspektrometrie mit dem induktiv gekoppelten Plasma (ICP-MS) .....	22
3.5.1 Quadrupol-Massenspektrometer .....	24
3.5.2 Probeneintrag .....	26
3.5.2.1 Pneumatische Zerstäubung.....	26
3.5.2.2 Sprühkammern .....	27
3.5.2.3 Laserablation .....	28
3.5.3 Konventionelle ICP-MS-Analyse .....	28
3.5.4 Einzelpartikel-Analyse .....	29
3.6 Quantifizierung des Ag-Gehaltes.....	32
3.6.1 Externe Kalibrierung .....	32
3.6.2 Fließinjektionsanalyse .....	32
3.6.3 Isotopenverdünnungsanalyse .....	33
4 Experimentelles .....	36
4.1 Chemikalien und Gase .....	36
4.2 Nanopartikel .....	37
4.3 Materialien und Geräte .....	37
4.3.1 Feldflussfraktionierung.....	37

4.3.2	Hohlfaser-Fluss-Feldflussfraktionierung-ICP-MS .....	38
4.3.3	Hochdruckflüssigkeitschromatographie.....	38
4.3.4	UV/Vis-Detektion .....	38
4.3.5	ICP-MS .....	38
4.3.6	Laserablation-ICP-MS.....	39
4.3.7	Weitere Materialien und Messgeräte .....	40
4.4	Probenvorbereitung .....	40
4.4.1	Blindwertstudie .....	40
4.4.2	Bestimmung des Gesamt-Ag-Gehaltes.....	41
4.4.3	Bestimmung des Gehaltes an Ag <sup>+</sup> -Ionen mittels Ultrafiltration .....	41
4.4.4	Optimierung der ICP-MS .....	41
4.4.5	<i>Off-line</i> AF4-ICP-MS-Experimente mit Fraktionssammlung .....	42
4.4.6	<i>On-line</i> AF4-ICP-MS .....	42
4.4.7	Probenverluste im AF4-System .....	43
4.4.8	Hochdruckflüssigkeitschromatographie-ICP-MS.....	43
4.4.9	Laserablation-ICP-MS.....	45
4.4.10	Einzelpartikel-ICP-MS.....	46
4.4.11	Dynamische Lichtstreuung und Zetapotential-Experimente .....	46
4.4.12	UV/Vis-Spektrometer .....	46
4.4.13	Sekundärelektronenmikroskopie im Transmissions-Modus .....	47
4.4.14	Huminsäure-Suspension.....	47
5	Ergebnisse und Diskussion .....	48
5.1	Bestimmung des Blindwertes .....	48
5.2	Bestimmung des Gesamtsilbergehaltes .....	48
5.3	DLS und Zetapotential .....	49
5.4	Charakterisierung mit der AF4-ICP-MS-Kopplung .....	52
5.4.1	<i>Off-line</i> Charakterisierung von BAM N-001 mit der AF4-UV/Vis-ICP-MS-Kopplung 52	
5.4.2	Verwendung eines internen Standards .....	61
5.4.3	Laserablation-ICP-MS von Probenverlusten auf der Membran .....	62
5.4.4	<i>On-line</i> Charakterisierung von BAM N-001 mit der AF4-ICP-MS.....	64
5.4.5	Probenverluste im AF4-System .....	66
5.4.6	Quantifizierung von Ag-Rückständen auf der AF4-Membran mittels Laserablation- ICP-MS 66	
5.4.7	Einfluss des Gehaltes an Ag <sup>+</sup> -Ionen auf die AF4-Analyse .....	69
5.4.8	Vergleich des zertifizierten Durchmessers mit den AF4-Werten .....	70

5.4.9	AF4-ICP-MS von Citrat-stabilisierten Ag-NP .....	74
5.5	Hohlfaser-Fluss-Feldflussfraktionierung-ICP-MS .....	76
5.5.1	Methodenentwicklung .....	76
5.5.2	Analytische Güteziffern .....	80
5.6	Einzelpartikel-ICP-MS .....	83
5.6.1	Optimierung der Probenvorbereitung .....	83
5.6.2	Optimierung der Transporteffizienz.....	84
5.6.3	Optimierung der Partikelkonzentration .....	85
5.6.4	Optimierung der Integrationszeit .....	85
5.6.5	Isotopenverdünnungsanalyse in Kombination mit der Einzelpartikel-ICP-MS ...	88
5.6.5.1	Anwendung der Isotopenverdünnungsanalyse-Einzelpartikel-ICP-MS.....	90
5.6.5.2	Vergleich der Isotopenverdünnungsanalyse-Einzelpartikel-ICP-MS mit der konventionellen Einzelpartikel-ICP-MS.....	93
5.6.5.3	Einfluss der Matrix in der Einzelpartikel-ICP-MS .....	94
5.7	Hochdruckflüssigkeitschromatographie .....	98
5.7.1	Eluentenoptimierung.....	98
5.7.2	Trennung.....	99
5.7.3	Quantifizierung.....	101
5.7.4	Trennmechanismus .....	103
5.8	Methodenvergleich .....	107
5.9	Interaktion von Huminstoffen mit Ag-NP.....	109
5.9.1	Hohlfaser-Fluss-Feldflussfraktionierung-ICP-MS .....	109
5.9.1.1	Detektorauswahl für die Huminsäuren.....	109
5.9.1.2	Zeitabhängiger Einfluss der Huminsäuren auf die Ag-NP.....	111
5.9.2	Einzelpartikel-ICP-MS.....	113
5.9.3	Hochdruckflüssigkeitschromatographie.....	114
6	Zusammenfassung und Ausblick .....	116
7	Literatur .....	120
8	Publikationsverzeichnis.....	134
9	Selbstständigkeitserklärung .....	136





## Abkürzungsverzeichnis

AF4	Asymmetrische Fluss-Feldflussfraktionierung
$A_i$	Fläche unter Exponentialfunktion
$A_{NP}$	Anzahl an detektierten Partikeln
b	Steigung
bzw.	beziehungsweise
CFFF	Zentrifugal-Feldflussfraktionierung
c	Konzentration
$c_0$	Konzentration an der Membran
ca.	circa
$c_{IS}$	Konzentration des isopenangereicherten Standards
$c_{NP}$	Partikelanzahlverteilung
$c_p$	Konzentration der Probe
cps	Impulse pro Sekunde (engl. <i>counts per second</i> )
$c_x$	Konzentration in Abhängigkeit des Abstandes x von der Membran
D	Diffusionskoeffizient
DAD	Diodenzeilendetektor
DF	Detektorfluss
$d_H$	Hydrodynamischer Durchmesser
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DLVO-Theorie	Theorie nach Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeek
$d_{NP}$	Geometrischer Partikeldurchmesser
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E	Elektrische Feldstärke
Engl.	Englisch
EP	Einzelpartikel-Modus
$E_s$	Gestreutes Feld
f	Reibungskoeffizient
F	Kraft des Querflusses
FFF	Feldflussfraktionierung
FIA	Fließinjektionsanalyse
$f(I_{NP})$	Gemessene Pulsfrequenz
FIFFF	Fluss-Feldflussfraktionierung
$f_{NP}$	Partikelmassenfluss
FZ	Fokussierungszeit

$g^{(1)}$	Autokorrelationsfunktion der zeitlichen Änderung des gestreuten, elektrischen Feldes
$g^{(2)}$	Autokorrelationsfunktion der zeitlichen Änderung der Streuintensität
Ggf.	Gegebenenfalls
$g_k^{\text{fit}}$	Anpassungsfunktion
GPC	Größenausschlusschromatographie/Gelpermeationschromatographie
h	Isotopenhäufigkeit
$h_p$	Peakhöhe
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HS	Huminsäure/-n
I	Streuintensität
ICP-MS	Induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie
ICP-Q-MS	Induktiv gekoppelte Plasma-Quadrupol-Massenspektrometrie
$I_{\text{NP}}$	Intensität vom NP-Signal
IS	Isotopenangereicherter Standard
$I_{\text{UG}}$	Intensität vom Untergrund
IV	Injektionsvolumen
IVA	Isotopenverdünnungsanalyse
k	Boltzmann-Konstante
K	Kalibrierfaktor
$K_{\text{av}}$	Spezifischer Verteilungskoeffizient
l	Mittlere Schichtdicke
LA	Laserablation
m	Masse
M	Molare Masse
$M_f(t)$	Zeitabhängiger Massenfluss
$m_p$	Masse eines einzelnen Ag-NP
m/z-Verhältnis	Masse-zu-Ladungsverhältnis
$n_0$	Brechungsindex der durchstrahlten Lösung
nat	Natürliches Isotopenverhältnis
Nd:YAG Laser	Neodym-dotierte Yttrium-Aluminium-Granat-Laser
$N_{\text{IS}}$	Stoffmenge des isotopenangereicherten Standards
NIST	National Institute of Standards and Technology
NM	Nanomaterial/-ien
$N_{\text{NP}}$	Partikelanzahlkonzentration

NOM	Natürliche, organische Substanzen
NP	Nanopartikel
N <sub>P</sub>	Stoffmenge der Probe
NWG	Nachweisgrenze
P	Probe
PA	Penicillamin
Pé	Péclet-Zahl
PEEK	Polyetheretherketon
PEG	Polyethylenglykol
PES	Polyethersulfon
PFA	Perfluoralkoxyalkan
PMMA	Polymethylmethacrylat
PS	Polystyrol
PVP	Polyvinylpyrrolidon
$\vec{q}$	Streuvektor
QF	Querfluss
q <sub>liq</sub>	Probenflussrate
Q-MS	Quadrupol-Massenspektrometrie
R	Rest an einem organischen Molekül
reg. Cellulose	Regenerierte Cellulose
Rel. Einh.	Relative Einheit
r <sub>f</sub>	Faserradius
r <sub>f, z</sub>	Faserradius entlang der z-Achse
r <sub>H</sub>	Hydrodynamischer Radius
R <sub>i</sub>	Intensitätsgewichteter hydrodynamischer Durchmesser
$R\left(\frac{\text{Isotop 1}}{\text{Isotop 2}}\right)$	Isotopenverhältnis
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
R <sub>v</sub>	Retentionsverhältnis
SAXS	Kleinwinkelröntgenstreuung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Sekundärelektronenmikroskopie
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
SF	Spülfluss
ST	Strömungsteiler
STF	Strömungsteilerfluss

T	Temperatur
$t_0$	Retentionszeit eines nicht-retardierten Analyten
$t_A$	Analysenzeit
$t_d$	Integrationszeit
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
ThFFF	Thermische Feldflussfraktionierung
$t_r$	Retentionszeit eines retardierten Analyten
TSEM	Sekundärelektronenmikroskopie im Transmissions-Modus
$U(r_f, z)$	Radiale Fließgeschwindigkeit an der HF5-Membranwand
u.a.	Unter anderem
UPC	Umkehrphasenchromatographie
$U_x$	Vom Querfluss induzierte Geschwindigkeit
ÜZ	Übergangszeit
V	Probenflussrate
$V^0$	Geometrisches Volumen des Kanals
$V_0$	Säulen-Ausschlussvolumen
$V_{Aus}$	Volumetrische Flussrate am Faserausgang
$V_c$	Volumenstrom des Querflusses
$V_e$	Analyt-spezifisches Elutionsvolumen
$V_{Ein}$	Volumetrische Flussrate am Fasereingang
$V_r$	Retentionsvolumen
$V_S$	Säulenvolumen
$v_w$	Wanderungsgeschwindigkeit
w	Kanaldicke
x	Abstand von der Membran
z.B.	Zum Beispiel
$\Gamma$	Abklingkonstante
$\epsilon$	Dielektrizitätskonstante
$\zeta$	Zetapotential
$\eta$	Dynamische Viskosität
$\eta_0$	Viskosität
$\eta_n$	Transporteffizienz
$\theta$	Streuwinkel
$\lambda$	Wellenlänge
$\lambda_r$	Retentionsparameter

$\rho_p$	Partikeldichte
$\sigma$	Peakbreite
$\sigma_{UG}$	Standardabweichung vom Untergrund
$T$	Verzögerungszeit



## 1 Einleitung

Mit seinem Vortrag *There is plenty of room at the bottom* begründete Richard P. Feynmann 1959 das Feld der Nanotechnologie. Seine Vision und die Erfindung des Rastertunnelmikroskops 1981 führten zu einem signifikanten Anstieg des wissenschaftlichen Interesses an Nanomaterialien (NM). [1]

Eine Besonderheit der NM ist das hohe Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis. Dabei liegen bei einem sphärischen Nanopartikel (NP) mit einem Durchmesser von etwa 100 nm 2-3% der Atome an der Oberfläche. Bei einem 10 nm großen Partikel sind es bereits 20-25% und bei 3 nm 45-60%. [2] Das sorgt für eine hohe Reaktivität beim Einsatz von z.B. Silber, Gold und Platin NP als Katalysatoren. Eine weitere Besonderheit liegt in ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften, welche sich signifikant von denen größerer Strukturen unterscheiden. So können NM z.B. eine große Bandlücke, eine modifizierte Bandenstruktur, eine veränderte Elektronenmobilität oder Dielektrizitätskonstante sowie andere optische Eigenschaften als mikro- oder mesostrukturierte Materialien besitzen. Diese Effekte treten größenabhängig und spontan auf. Ein Material kann daher verschiedene kritische Größen für unterschiedliche Eigenschaften aufweisen. Durch die Änderung der Größe können während der Synthese die gewünschten Eigenschaften eingestellt werden. [3] NM können dabei aus anorganischen, organischen, biologischen und Hybrid-Stoffen bestehen. Ihre Form kann u.a. sphärisch, kubisch, stäbchenförmig oder plättchenartig sein. [1]

Die heute am häufigsten verwendete Definition von NM ist die Empfehlung der Europäischen Kommission, welche besagt: „Nanomaterial‘ ist ein natürliches, bei Prozessen anfallendes oder hergestelltes Material, das Partikel in ungebundenem Zustand, als Aggregat oder als Agglomerat enthält, und bei dem mindestens 50% der Partikel in der Anzahlgrößenverteilung ein oder mehrere Außenmaße im Bereich von 1 nm bis 100 nm haben.“ Dabei gilt Folgendes: Ein „Agglomerat‘ ist eine Ansammlung schwach gebundener Partikel oder Aggregate, in der die resultierende Oberfläche ähnlich der Summe der Oberflächen der einzelnen Bestandteile ist“, und ein „Aggregat‘ ist ein Partikel aus fest gebundenen oder verschmolzenen Partikeln.“ (Empfehlung der Kommission zur Definition von Nanomaterialien, 2011/696/EU [4]) Hierbei werden jedoch die besonderen Charakteristika der NM, welche teilweise auch noch bei Größen von 200 nm oder 300 nm auftreten können, nicht berücksichtigt. [2]

In einigen Bereichen von Konsumgütern wurden daher bereits zusätzliche Verordnungen erlassen, die das Inverkehrbringen und die Kennzeichnung von NM, teilweise basierend auf der zuvor genannten Definition, regeln. Die Lebensmittelinformationsverordnung besagt, dass

zugesetztes „technisches Nanomaterial“ eindeutig durch den Namenszusatz „nano“ gekennzeichnet werden muss. Als technisches NM wird hierbei „absichtlich hergestelltes Nanomaterial“ (Lebensmittelinformationsverordnung, 2011/1169/EG [5]) bezeichnet. Laut Lebensmittelkontaktverordnung (2011/10/EU) dürfen nur bestimmte NM in mehrschichtigen Kunststoffen eingesetzt werden, welche spezifische Migrationswerte einhalten müssen. [6] Eine weitere Regelung zur Verwendung und Klassifizierung von NP liegt im Bereich von Kosmetika vor. Die Verordnung über kosmetische Mittel (2009/1223/EG) besagt, dass kosmetischen Mittel, die NM enthalten, der Kommission sechs Monate vor dem Inverkehrbringen gemeldet werden müssen. Es müssen dabei Angaben zur Spezifikation wie Größe, chemische und physikalische Eigenschaften, Quantität der pro Jahr in Verkehr gebrachten NP, Toxikologie, Sicherheitsdaten und Expositionsbedingungen gemacht werden. Zudem müssen die Produkte auch hier mit dem Namenszusatz „nano“ gekennzeichnet werden. [7] Ein weiteres Gebiet von Konsumgütern deckt die Biozidverordnung (EU) Nr. 528/2012 ab, unter welche auch Textilien und Farben fallen. Dabei muss für die Zulassung eines Biozidproduktes, welches NM enthält, das „Risiko für Mensch und Tiere und für die Umwelt gesondert“ (Biozidverordnung, 2012/527/EU [8]) bewertet werden und das NM ebenfalls mit der Abkürzung „nano“ gekennzeichnet werden. Die Definition eines NM basiert hier auf der Definition der Europäischen Kommission. [8] NM werden auch nach REACH-Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 reguliert, worunter ebenfalls eine Risikoabschätzung fällt. Hierbei existieren jedoch keine speziellen Vorgaben für NM hinsichtlich der anzugebenden Daten. [9]

In Folge der gesetzlichen Regelungen ist es notwendig, geeignete Analysemethoden zu ihrer Identifikation und Charakterisierung zu entwickeln. Da bisher keinerlei standardisierte Methoden zur Verfügung stehen, werden derzeit eine Vielzahl unterschiedlicher Verfahren eingesetzt. Die Detektion und Bestimmung der Größe erfolgt mit der dynamischen Lichtstreuung (DLS), der UV/Vis-Spektroskopie, der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) oder der Kleinwinkelröntgenstreuung (SAXS). Viele dieser Verfahren sind jedoch nicht in der Lage, NP in umweltrelevanten Konzentrationen, in komplexen Matrizen und Mischungen verschiedener NP-Größen oder Elementzusammensetzungen sowie eine breite Größenverteilung zu analysieren. [10-15]

Um die Komplexität der Probe zu reduzieren, werden somit oft Trenntechniken, wie die Feldflussfraktionierung (FFF) [16-18], hydrodynamische Chromatographie [19-21], die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) [22-24] und seit Kurzem die Hohlfaser-Fluss-Feldflussfraktionierung (HF5) [25, 26] mit einem geeigneten Detektor kombiniert. Für eine empfindliche, elementspezifische Detektion wird häufig die ICP-MS eingesetzt. Die Kopplung der asymmetrischen Fluss-Feldflussfraktionierung (AF4) und der ICP-MS ermöglicht eine



Fraktionierung und eine Bestimmung der Elementverteilung von NP. [27-30] Herausforderungen sind hierbei die Methodenentwicklung und -validierung [31], da häufig zertifizierte NP-Referenzmaterialien fehlen [11, 32] sowie die Erzielung hoher Wiederfindungsraten [24, 33]. Das AF4-ICP-MS-Verfahren ermöglicht die Bestimmung der Partikelgröße und der Gesamtkonzentrationen einzelner Fraktionen, jedoch nicht der Partikelanzahlverteilung. Zudem ist es nicht möglich, mit diesem Verfahren Gehalte an  $\text{Ag}^+$ -Ionen zu ermitteln. Die HPLC kann NP von ihren korrespondierenden Ionen trennen. [24, 34, 35] Unter der Verwendung spezieller Säulen kann dabei eine Trennung über den gesamten NM-Definitionsbereich erzielt werden. [23] Zur Analyse einzelner NP wird vermehrt die ICP-MS im Einzelpartikel-Modus (EP-ICP-MS) verwendet. Damit können eine Bestimmung des Elementgehaltes einzelner Partikel und bei bekannter Form der tatsächliche Radius sowie die Partikelanzahl erfolgen. [36, 37]

Eine besondere Herausforderung ist die Analyse von NP in komplexen Matrizen. Ag-NP werden aufgrund ihrer antibakteriellen Eigenschaft vielfach in diversen Konsumgütern eingesetzt. Daher muss von einer vermehrten Exposition der Umwelt ausgegangen werden. Da ihr Umweltverhalten bisher nicht vollständig verstanden ist, ist dessen Aufklärung von besonderem wissenschaftlichem Interesse. [38] Hierzu wurde mehrfach die Interaktion von NP mit natürlichen organischen Stoffen, wie Huminstoffen, untersucht. [38-42] Dabei wurden u.a. die Änderung der Oberflächenladung sowie die Bildung von Aggregaten/Agglomeraten von Ag-NP in Abhängigkeit des zugegebenen Huminstoffgehaltes [43] und unter Umweltbedingungen (pH-Wert, Salzgehalt, Temperatur) ermittelt. [44-47] In vielen Arbeiten stand die direkte Synthese von Ag-NP in Anwesenheit von Huminstoffen im Vordergrund. [44, 48, 49] Dagegen beschäftigten sich nur wenige Publikationen mit der Ermittlung der Größen und -verteilung der NP sowie deren Änderung nach Huminstoffzugabe. [50-52]

Offene Fragen beinhalten die Untersuchung von Wiederfindungsraten und Verlusten von NP in der AF4, die Analyse von Ag-NP in komplexerer Matrix, wie Meerwasser, mittels EP-ICP-MS sowie die Entwicklung einer Quantifizierungsmethode mittels HPLC-ICP-MS und die Aufklärung des Trennmechanismus. Ein Vergleich der genannten Ansätze ist ebenso von hohem wissenschaftlichem Interesse wie die Untersuchung des ungeklärten Umweltverhaltens von Ag-NP in einer Huminsäure(HS)-haltigen Suspension.

## 2 Aufgabenstellung

Das Ziel dieser Promotionsarbeit stellte die Entwicklung geeigneter Methoden zur Charakterisierung von Ag-NP basierend auf der Definition der Europäischen Kommission und den EU-Regularien dar. Der Fokus lag hierbei auf der Größe und der Konzentration. Dafür sollten unterschiedliche Trennverfahren, wie die AF4 und die HPLC in Kombination mit der ICP-MS sowie die EP-ICP-MS miteinander verglichen werden.

Ein Schwerpunkt war die Optimierung einer FFF-Trennmethode im Hinblick auf eine hohe Auflösung und hohe Wiederfindungsraten. Letzteres ist eine besondere Herausforderung. Bereits existierende Theorien über mögliche Verluste sollten im Rahmen dieser Arbeit systematisch untersucht werden. Besonderer Fokus lag auf der Laserablation-ICP-MS (LA-ICP-MS), die als bildgebendes Verfahren in der Lage ist, Verluste auf der Membran zu lokalisieren und zu quantifizieren.

Da geeignete Ag-NP-Referenzmaterialien zur Methodenoptimierung und -validierung sowie zur Größenbestimmung fehlen, sollten die erhaltenen Ergebnisse mit anderen Verfahren wie der DLS, HPLC und EP-ICP-MS verglichen werden. Dafür sollte die von Soto Alvaredo *et al.* entwickelte HPLC-Trennmethode von Ag-NP und Ag<sup>+</sup>-Ionen im Rahmen dieser Arbeit an der BAM etabliert und um eine geeignete Quantifizierungsmethode ergänzt werden. Als direktes Analysenverfahren ohne vorherige Trennung der NP diene die ICP-MS im EP-Modus. Diese ist in der Lage, die Partikelanzahlgrößenverteilung zu bestimmen. Hierfür musste eine Methode zur Analyse von komplexen NP-Proben entwickelt werden. Als Analyten dienten dabei zwei häufig in Konsumgütern eingesetzte Ag-NP-Typen mit unterschiedlicher Oberflächenbeschichtung. Am Beispiel dieser sollten die Vor- und Nachteile der einzelnen Verfahren abgewogen werden.

Im letzten Schritt dieser Arbeit stand die Übertragung der entwickelten Methode zur Untersuchung des Verhaltens von der NP in einer natürlichen Umwelt-Umgebung im Fokus. Als Modellumgebung für ein Oberflächengewässer wurde dafür eine HS-haltige Wasser-Matrix gewählt.

### 3 Theoretische Grundlagen

#### 3.1 Charakteristische Größen von Nanopartikeln

Nanopartikel in Lösung gehören zu den Dispersionskolloiden. Darunter werden thermodynamisch instabile, lyophobe (schwerlösliche) Partikel, welche in einem flüssigen Medium dispergiert sind, verstanden. Um die Eigenschaften der Dispersionskolloide und ihre Stabilität in einem flüssigen Medium zu beschreiben, werden u.a. der hydrodynamische Durchmesser und das Zetapotential verwendet. Eine der wichtigsten Kenngrößen in der Analyse von NP ist ihr Durchmesser. Dabei muss man zwischen dem geometrischen und dem hydrodynamischen Durchmesser unterscheiden. Der geometrische oder Kerndurchmesser bezeichnet den Durchmesser des Kernes ohne Stabilisatoren. Diese kann z.B. mittels TEM oder EP-ICP-MS bestimmt werden. Der hydrodynamische Durchmesser oder auch Stokessche Durchmesser bezeichnet den effektiven NP-Durchmesser in einer Lösung. Dieser berücksichtigt neben dem Stabilisator auch die Moleküle des Lösungsmittels in der Solvathülle. [2, 3]

##### 3.1.1 Der hydrodynamische Durchmesser

Der hydrodynamische Durchmesser wird am häufigsten mit der dynamischen Lichtstreuung (DLS), auch Photonenkorrelationsspektroskopie genannt, bestimmt. Es handelt sich um ein absolutes Messverfahren für sphärische Partikel, welches keine Kalibrierung benötigt. Hierbei trifft ein vertikal polarisierter, monochromatischer Laserstrahl, der durch eine Blende fokussiert wird, auf eine kolloidale Suspension. Der Strahl wird an den sich in der Probe befindenden Partikeln teilweise gestreut. Partikel, deren Durchmesser deutlich kleiner als die Wellenlänge  $\lambda$  des Lasers ( $d \leq \frac{\lambda}{20}$ ) sind, werden als Punktstreuer betrachtet und ihr Streulicht als Rayleigh-Streuung bezeichnet. Größere Partikel haben mehrere Streuzentren, deren Streulicht demzufolge interferieren kann.

Ein Detektor misst die Richtung und die Intensität der gestreuten Strahlung sowie deren zeitabhängige Schwankungen in Abhängigkeit vom Streuwinkel  $\theta$ . Der Streuvektor  $\vec{q}$  beschreibt die Richtung der Streuung. Dieser ergibt sich aus der Differenz des Vektors des einfallenden Lichts und des gestreuten Lichts. Seine Länge beschreibt Gleichung 1.

$$|\vec{q}| = q = \frac{4 \cdot n \cdot n_0}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (1)$$

mit

$n_0$  = Brechungsindex der durchstrahlten Lösung

Zur zeitabhängigen Schwankung der Streulichtintensität kommt es durch die Brownsche Molekularbewegung der NP, einer ungerichteten Bewegung in allen drei Dimensionen. Diese führt zu einer Veränderung der Abstände der Streuzentren, wodurch eine Fluktuation der Streuintensitäten entsteht. Zudem befinden sich mehrere Partikel in dem Streuzentrum, wodurch es zu weiteren Interferenzen des gestreuten Lichtes kommen kann. Über die zeitliche Änderung des gestreuten, elektrischen Feldes wird eine zeitabhängige Autokorrelationsfunktion  $g^{(1)}$  erhalten.

$$g^{(1)}(\mathbf{q}, \tau) = \frac{\langle E_s(\vec{q}, 0) E_s(\vec{q}, \tau) \rangle}{\langle I(\vec{q}) \rangle} \quad (2)$$

mit

$\tau$  = Verzögerungszeit,  $E_s$  = gestreutes Feld,  $I$  = Streuintensität

Eine zweite Autokorrelationsfunktion beschreibt die zeitliche Änderung der Streuintensität.

$$g^{(2)}(\mathbf{q}, \tau) = \frac{\langle I(\vec{q}, 0) I(\vec{q}, \tau) \rangle}{\langle I(\vec{q}) \rangle^2} \quad (3)$$

Unter Annahme einer Gaußschen Verteilung können beide Funktionen über die Siegert-Beziehung in Relation gesetzt werden. [53]

$$g^{(2)}(\mathbf{q}, \tau) = 1 + [g^{(1)}(\mathbf{q}, \tau)]^2 \quad (4)$$

Über die Abklingkonstante  $\Gamma$  der Korrelationsfunktion kann der Diffusionskoeffizient  $D$  für monodisperse, sphärische Teilchen in verdünnter Lösung erhalten werden.

$$g^{(1)}(\mathbf{q}, \tau) = \exp(-q^2 D \tau) = \exp(-\Gamma \tau) \quad (5)$$

Der hydrodynamische Durchmesser  $d_H$  ergibt sich aus der Stokes-Einstein-Beziehung. [53, 54]

$$D = \frac{k \cdot T}{3 \cdot \pi \cdot d_H \cdot \eta} \quad (6)$$

mit

$\eta$  = dynamische Viskosität,  $k$  = Boltzmann Konstante,  $T$  = Temperatur

Zur Berechnung des intensitätsgewichteten hydrodynamischen Durchmessers, summiert eine Anpassungsfunktion  $g_k^{\text{fit}}$  die einzelnen Exponentialfunktionen.

$$g_k^{\text{fit}} = \sum_i A_i e^{\Gamma_i \tau_i} \quad (7)$$

mit

$A_i$  = Fläche unter jeder Exponentialfunktion

Der intensitätsgewichtete hydrodynamische Radius  $R_i$  ergibt sich aus Gleichung 8.

$$\langle r_i \rangle = \frac{\sum A_i R_i}{\sum A_i} \quad (8)$$

Als Maß für die Größenverteilung polydispenser NP Systeme, dient die intensitätsgewichtete Peakbreite  $\sigma$ . [55]

$$\sigma = \frac{\sqrt{\langle R^2 \rangle - \langle R \rangle^2}}{\langle R \rangle} \quad (9)$$

mit

$$\langle r^2 \rangle = \frac{\sum A_i R_i^2}{\sum A_i} \quad (10)$$

### 3.1.2 Stabilisierung und das Zetapotential

Nanopartikel sind aufgrund ihrer großen Oberfläche thermodynamisch instabil. Um eine Koagulation, d. h. eine ausfällende Aggregation, zu verhindern, muss eine kinetische Hemmung vorliegen. Kolloide sind somit thermodynamisch instabil und kinetisch stabil. Die Stabilisierung kann sterisch, elektrostatisch oder in Kombination beider Effekte erfolgen. Eine sterische Stabilisierung wird durch langkettige Moleküle erreicht. Die elektrostatische Stabilisierung erfolgt über die Oberflächenladung der Partikel und einer umgebenden Schicht mit entgegengesetzter Ladung z.B. des Dispersionsmittels. Wenn das Dispersionsmittel weitere Ladungsträger mit einer dem Partikel entgegengesetzten Ladung enthält, werden diese ebenfalls an der Partikeloberfläche adsorbiert. Dabei bleibt die Elektronneutralität erhalten. Diese Schicht wird als elektrochemische Doppelschicht bezeichnet. Das Stern-Modell beschreibt die Doppelschicht als Kombination einer unbeweglichen Schicht der NP-Oberfläche (nach Helmholtz) und einer umgebenden, diffusen Schicht (nach Gouy-Chapman). Das Modell besagt, dass zwischen der Oberfläche des Partikels und den Gegenionen ein Mindestabstand besteht. Eine schematische Darstellung der elektrochemischen Doppelschicht ist in Abbildung 1 wiedergegeben.

Zwischen den NP kommt es zu intermolekularen Wechselwirkungen. Durch die Doppelschicht stoßen sich die einzelnen NP ab und bleiben suspendiert. Die Stabilität von NP

in einer Suspension wird durch die Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek(DLVO)-Theorie beschrieben. Diese besagt, dass ein Gleichgewicht zwischen repulsiven und anziehenden Van-der-Waals-Kräften benachbarter Partikel herrscht, was graphisch durch das Lennard-Jones-Potential in Abbildung 2 dargestellt wird.

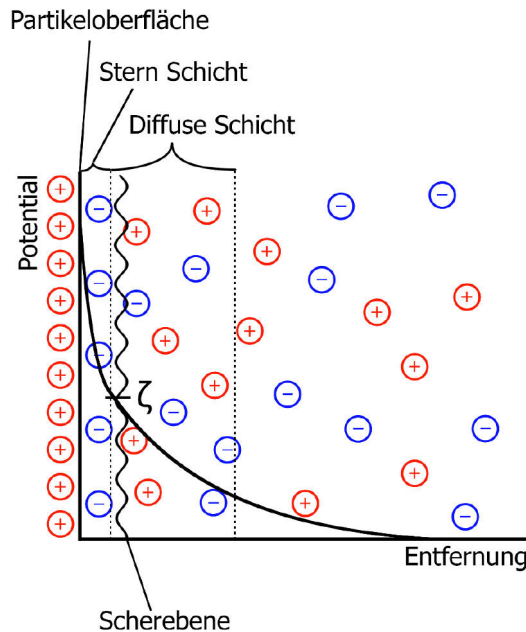


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Oberflächenladung eines NP nach Stern sowie die Position des Zetapotentials.

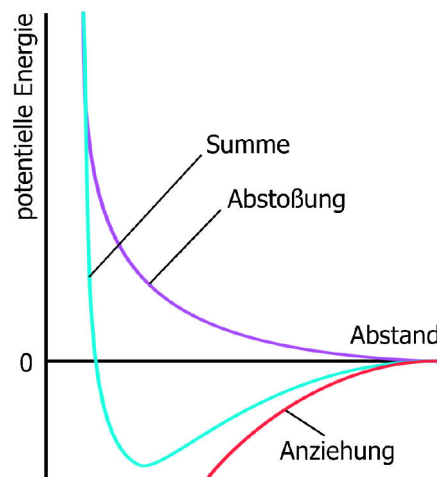


Abbildung 2: Das Lennard-Jones-Potential.

Die Zugabe weiterer Ladungsträger verändert die Doppelschicht. Eine hohe Ionenstärke kann zur Ausbildung einer kompakten Doppelschicht um die Partikel führen, womit es zu geringeren Abständen zwischen den Partikeln kommt. Dabei ziehen sich die Partikel an, und es kommt zur Koagulation.

Die Stabilität von NP in einer Suspension wird durch das Zetapotential beschrieben. Das Zetapotential beschreibt die elektrische Potentialdifferenz zwischen der Partikeloberfläche des Scherradius und dem flüssigen Medium. Als Scherradius wird der Radius bezeichnet, welcher sich mit dem Partikel in einer Flüssigkeit bewegt. Diese ist die feste Schicht, die das Partikel umgibt, und ein kleiner Teil der diffusen Schicht. Da die genaue Position des Scherradius unbekannt ist, wird oftmals vereinfacht das Potential an der Stern-Schicht, der unbeweglichen Schicht um das Partikel, als Annäherung für das Zetapotential verwendet. Das Zetapotential wird durch das Anlegen eines elektrischen Feldes an die Suspension bestimmt. Durch die Potentialdifferenz wandern die Partikel im elektrischen Feld in Richtung einer Elektrode. Dieses wird auch Elektrophorese genannt. Die Smoluchowski-Gleichung beschreibt den Zusammenhang zwischen der gemessenen Wanderungsgeschwindigkeit  $v_w$  und dem Zetapotential  $\zeta$ . [54, 56]

$$v_w = \frac{\epsilon \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot \eta_0} \cdot \zeta \quad (11)$$

mit

$\epsilon$  = Dielektrizitätskonstante,  $E$  = elektrische Feldstärke,  $\eta_0$  = Viskosität

Vereinfacht kann eine Suspension mit einem Zetapotential negativer als -30 mV oder positiver als +30 mV als stabil betrachtet werden. So gilt eine Suspension mit einem Potential zwischen -5 mV und +5 mV beispielsweise als instabil. [57, 58]

### 3.2 Silber-Nanopartikel

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Ag-NP untersucht. Diese werden aufgrund ihrer herausragenden antibakteriellen Eigenschaften in einer Vielzahl von unterschiedlichen Produkten, dazu gehören u.a. Kühlschrankschichtungen, Kosmetika, Baby-Trinkflaschen und Kleidung, eingesetzt. [59] Im Jahr 2008 wurde von Blaser *et al.* [60] prognostiziert, dass die europäische Silberproduktion für die Verwendung in Konsumgütern im Jahr 2010 110-230 t erreicht. Im selben Jahr postulierten Müller *et al.* [61], dass die weltweite Produktion an Ag-NM im Jahr 2008 einen Wert von 500 t erreicht.

Neben dem verbreiteten Einsatz in Konsumgütern könnten Ag-NP auch als Ersatz für organische antibakterielle Substanzen, Antibiotika oder ihre Derivate dienen. Dies ist u.a. dem weit verbreiteten Einsatz von Antibiotika und der damit verbundenen Resistenz zahlreicher Bakterien geschuldet. [62]

Diverse Untersuchungen zur Toxizität von Nanosilber zeigten, dass dieses ein effektives Biozid gegen Bakterien [63-66], Pilze [64, 66, 67] und Viren [66, 68] ist und ebenfalls toxisch

auf Algen [67, 69] wirkt. Bisher gibt es jedoch wenige Studien zum Mechanismus des antibakteriellen Effektes, der immer noch nicht vollständig verstanden ist. In Bezug auf die Wirksamkeit gegen Bakterien werden in der Literatur zumeist Mechanismen, die auf einer Freisetzung von Silberionen [63, 65, 69, 70] beruhen, vorgeschlagen. Diese können die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) [64, 65, 70] induzieren, die zur Schädigung der Zellmembran führen [62, 63, 71]. Im weiteren Verlauf können  $\text{Ag}^+$ -Ionen den P-, S- und N-Kreislauf nitrifizierender Bakterien inhibieren [72] sowie die Desoxyribonukleinsäure(DNS)-Transkription blockieren, was zu einer Störung der Bakterien-Respiration und Adenosintriphosphat-Synthese führt. [67] Allerdings sind die verschiedenen Angaben zur Toxizität untereinander teilweise widersprüchlich. [72] Verschiedene Studien lassen vermuten, dass die Silbertoxizität speziesabhängig ist und u.a. von der Partikelgröße, Oberflächenbeschaffenheit, dem Aggregationszustand und der Löslichkeit, jedoch nicht vom Gesamtsilbergehalt abhängt. [73-78] Eine genaue Charakterisierung der Partikel ist somit essentiell, um potentielle Effekte auf den Menschen und die Umwelt besser abschätzen zu können. [79]

Der steigende Einsatz von Ag-NP in unterschiedlichsten Konsumgütern führt zudem zu einer vermehrten Exposition der Umwelt. [60, 80, 81] Studien zeigen, dass es zum Herauslösen von Ag-NP und  $\text{Ag}^+$ -Ionen aus Kunststoffen [67, 82], Textilien [60, 83, 84] und Silberbeschichtungen [85] kommen kann. Untersuchungen zu Effekten von Umweltbedingungen, z.B. natürlichen organischen Substanzen (NOM), pH-Werten oder Salzkonzentrationen, ergaben, dass eine speziesabhängige Stabilisierung von Ag-NP und  $\text{Ag}^+$ -Ionen, Aggregation oder Auflösung von Ag-NP in Ionen stattfinden kann. [43, 45, 46, 73, 86, 87]

Eine weitere, besondere Eigenschaft der Ag-NP ist neben dem antibakteriellen Effekt die Oberflächenplasmonenresonanz. Diese beschreibt die kollektive Oszillation der Elektronen des Leitungsbandes. Diese Fähigkeit basiert auf der  $4d^{10} 5s^1$  Elektronenkonfiguration des Ag. Das Elektron im s-Orbital hat das höchste Energieniveau und kann aufgrund seiner Mobilität eine Oberflächenplasmonenresonanz erzeugen. Für Ag liegt die Anregungswellenlänge hierfür im optischen Bereich. Diese Eigenschaft tritt bei NP mit mehr als 15 Ag-Atomen auf und ist abhängig von der Größe und der Form der NP. Daher werden Ag-NP auch als Biosensoren für die Detektion biologischer Interaktion verwendet (oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie). [88] Bei kleinen NP oszillieren die freien Elektronen auf der Oberfläche mit dem elektrischen Feld des eingestrahlteten Lichtes und erzeugen so einen Dipol, wie Abbildung 3 darstellt. Größere NP mit einem Durchmesser von  $> 20$  nm zeigen die Bildung einer Quadrupol-Resonanz.



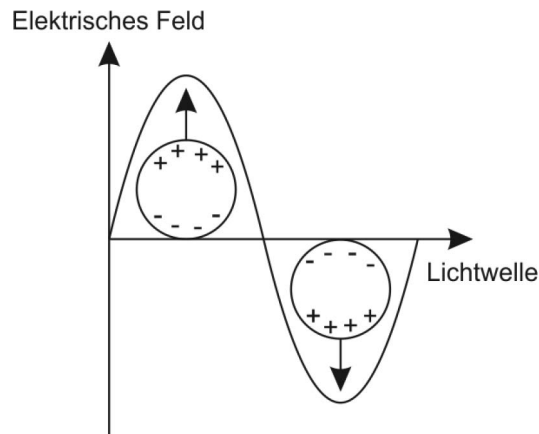


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Oberflächenplasmonenresonanz für kleine NP.

Die Absorptionswellenlänge der Oberflächenplasmonenresonanz wird ebenfalls stark von der Größe der NP beeinflusst. Die Absorptionswellenlänge ist für kleine NP ( $< 20$  nm) nahezu unabhängig von deren Durchmesser, der Absorptionspeak wird jedoch mit steigendem Durchmesser breiter. Für größere NP mit einem Durchmesser von  $> 20$  nm steigt die Absorptionswellenlänge und Breite des Absorptionspeaks mit steigendem Durchmesser. Diese starken Streu- und Absorptionsfähigkeiten beeinflussen die Detektion, z.B. mit einem UV/Vis-Detektor.

Die Größe der NP wird durch die Art der Synthese bestimmt. Diese kann entweder durch die Zerkleinerung eines Festkörpers mithilfe z.B. eines Lasers oder durch das Wachstum aus z.B. Metallsalzen erfolgen. Das Wachstumsverfahren erfolgt durch die Reduktion eines Silber-salzes (z.B. Silbernitrat) mit einem Reduktionsmittel in einer wässrigen oder organischen Lösung. Reduktionsmittel können u.a. Citrat, Ascorbinsäure, Natriumborhydrid und Aldehyde (Tollens-Reaktion) eingesetzt werden. Das Reduktionsmittel reduziert die  $\text{Ag}^+$ -Ionen zu Kristallisationskeimen. Diese werden durch einen zugegebenen Stabilisator, wie z.B. Polyvinylpyrrolidon stabilisiert. Einige Verbindungen wie z.B. Citrat oder Ethylenglykol können gleichzeitig als Reduktionsmittel und Stabilisator dienen. Durch die Anlagerung von  $\text{Ag}^+$ -Ionen an die Kristallisationskeime kommt es zum Partikelwachstum. Die Wahl des Lösungsmittels, Reduktionsmittels, Stabilisators sowie die Konzentration an Stabilisator und des eingesetzten Silbersalzes, Temperatur, Reaktionszeit und pH-Wert haben wiederum einen Einfluss auf die Form, Größe und Stabilität der erhaltenen NP. Somit können diverse Formen an Ag-NP, wie u.a. sphärische Partikel, Stäbchen und Dreiecke, Quadrate in unterschiedliche Größen synthetisiert werden, die unterschiedliche antibakterielle Eigenschaften und Oberflächenplasmonenresonanz aufweisen. [89, 90]

### 3.3 Huminstoffe

Im Rahmen dieser Arbeit soll auch das Umweltverhalten von Ag-NP untersucht werden. Als Modellsubstanz wurde dafür die Interaktion mit HS in wässrigen Proben ausgewählt.

Huminstoffe werden oft auch als Humus (lat. für *Erdboden*) oder humifizierte organische Substanzen bezeichnet und stellen amorphe, polydisperse Substanzen mit einer gelblichen bis schwarzbraunen Farbe dar. Zu den Huminstoffen gehören HS und Fulvinsäuren, Hymatomelansäuren und Humine. Am häufigsten kommen HS und Fulvinsäuren in Böden vor. Die verschiedenen Untergruppen unterscheiden sich in ihrer Löslichkeit und ihrem Molekulargewicht. Fulvinsäuren sind in basischen, sauren und wässrigen Systemen löslich und haben ein vergleichsweise geringes Molekulargewicht von  $800-9000 \text{ g mol}^{-1}$ . Fulvinsäuren haben oftmals einen höheren Anteil aliphatischer Verbindungen als HS. Letztere sind nur in basischen Milieus löslich und haben mit  $9000-500.000 \text{ g mol}^{-1}$  ein höheres Molekulargewicht als Fulvinsäuren. Hymatomelansäuren sind die in Alkohol löslichen Fraktionen, wohingegen Humine weder in basischen noch in sauren oder wässrigen Systemen löslich sind. Mit einer Molmasse  $> 300.000 \text{ g mol}^{-1}$  sind sie oft mit Silikaten assoziiert und können nur durch eine Base bei hohen Temperaturen extrahiert werden. Folglich wird unter Huminstoffen eine Gruppe von Substanzen verstanden, welche aus stochastisch zusammengesetzten Verbindungen bestehen und zumeist über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander assoziiert sind. Daher werden Huminstoffe auch als organische Polymere bezeichnet. Die Verbindungen können organische Hydroxyl- und Carbonylgruppen enthalten und sowohl aromatisch als auch aliphatisch sein. Dabei sind funktionelle Gruppen, wie Carboxy-, Hydroxy-, Carbonyl- und Ethergruppen, zu finden. Weiterhin können Teile von nicht zersetzten Ausgangsstoffen, wie z.B. Zucker, Peptide und Aminosäuren, enthalten sein. Dies resultiert in Gemischen einer Vielzahl von möglichen Strukturformen und -größen. Ein Beispiel für eine mögliche HS-Struktur stellt Abbildung 4 dar. Huminstoffe werden durch die Humifizierung im Boden hergestellt. Dieser Prozess ist bisher nicht vollständig verstanden. In der Literatur wird ein 3-Stufen-Mechanismus vermutet. Zunächst werden Pflanzenreste wie Lignine hydrolytisch in simple organische Verbindungen zersetzt. Im nächsten Schritt erfolgt eine Oxidierung durch Enzyme, gefolgt von einer Kondensation zu den Huminstoffen.

Der Anteil an Huminstoffen im Boden variiert je nach Herkunft stark und kann bis zu 15% betragen. Huminstoffe kommen nicht nur im Boden, sondern auch in Flüssen und Meeren, ihren Sedimenten sowie in Kohlen vor. Daher können terrestrische, aquatische und geologische Huminstoffe unterschieden werden, welche in ihrem Kohlenstoff-, Wasserstoff-, Stickstoff-, Sauerstoff- und Schwefelanteil variieren. Huminstoffe können z.B. Metallkationen komplexieren sowie mit Wasser, Pestiziden und Lehm assoziieren. Die Bindungsfähigkeit hängt dabei von den funktionellen Gruppen des jeweiligen Huminstoffes ab. [91-93]

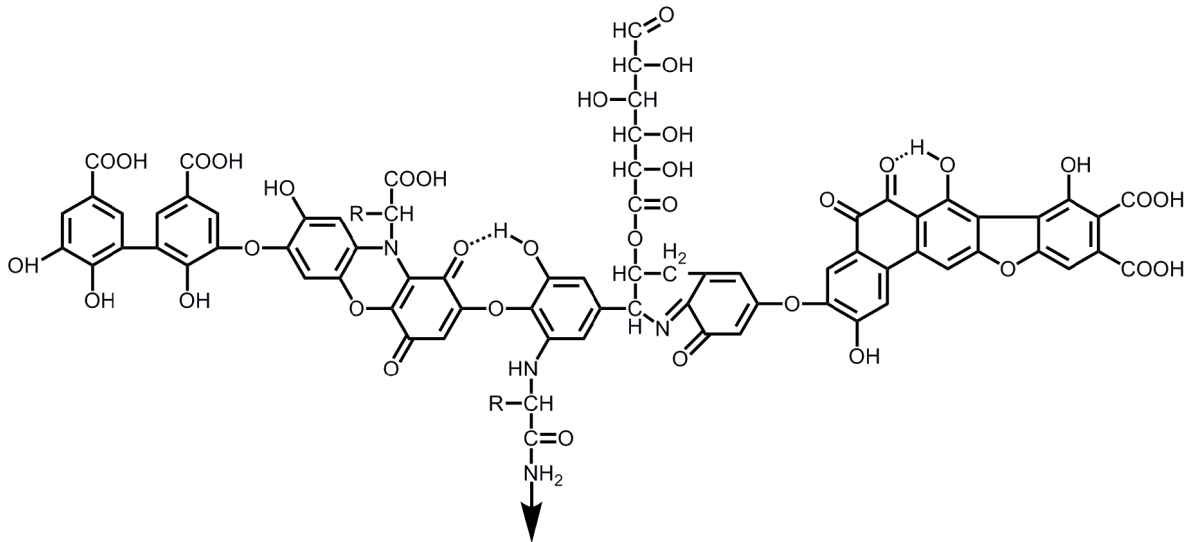


Abbildung 4: Modell einer HS-Struktur mit R = Alkyl-, Aryl- oder Aralkylgruppe.

### 3.4 Trennverfahren

Die Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers einer stark polydispersen Probe oder eines Gemisches von NP mit unterschiedlichen Durchmessern ist mittels DLS aufgrund der Interferenz der gestreuten Strahlung oftmals eine Herausforderung. Deshalb werden Trennverfahren, wie die FFF und die HPLC, eingesetzt. Diese separieren die NP vor der eigentlichen Detektion nach bestimmten physikalischen und chemischen Eigenschaften, wie z.B. dem Diffusionskoeffizienten (FFF), oder aufgrund der Wechselwirkung zwischen der mobilen und der stationären Phase (HPLC) und reduzieren somit die Komplexität der Probe vor der Detektion. Die beiden im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Trennverfahren der FFF und HPLC werden im Folgenden vorgestellt.

#### 3.4.1 Feldflussfraktionierung

##### 3.4.1.1 Das Trennprinzip

Das Prinzip der FFF wurde erstmals 1966 von J. C. Giddings beschrieben. [94] Der Begriff FFF beschreibt eine Klasse von Fluss-basierten Trenntechniken. Im Vergleich zur Chromatographie ist dabei keine stationäre Phase vorhanden, mit welcher die Probe wechselwirken kann. Das Prinzip basiert auf einem dünnen Kanal, der von einem Eluenten durchflossen wird. Durch die geringe Kanalhöhe (einige hundert  $\mu\text{m}$ ) wird ein laminarer Fluss mit einem parabolischen Flussprofil erzeugt. Senkrecht zu diesem Fluss wird eine Trennkraft angelegt. Da diese Kraft im Vergleich zur Chromatographie relativ schwach ist, wird die FFF als schonendes Trennverfahren bezeichnet. Als Trennkraft können u.a. ein zusätzlicher, senkrechter Fluss (Fluss-FFF [FIFFF]), eine Zentrifugalkraft (Zentrifugal-FFF [CFFF]) oder ein thermisches Feld fungieren (thermische FFF [ThFFF]). Je nach Art des angelegten Trennfeldes wird die Probe nach ihrem

Diffusionskoeffizienten, der effektiven Partikelmasse, ihrem Molekulargewicht oder ihrer Zusammensetzung getrennt. In Abbildung 5 ist das Prinzip der FFF schematisch wiedergegeben.

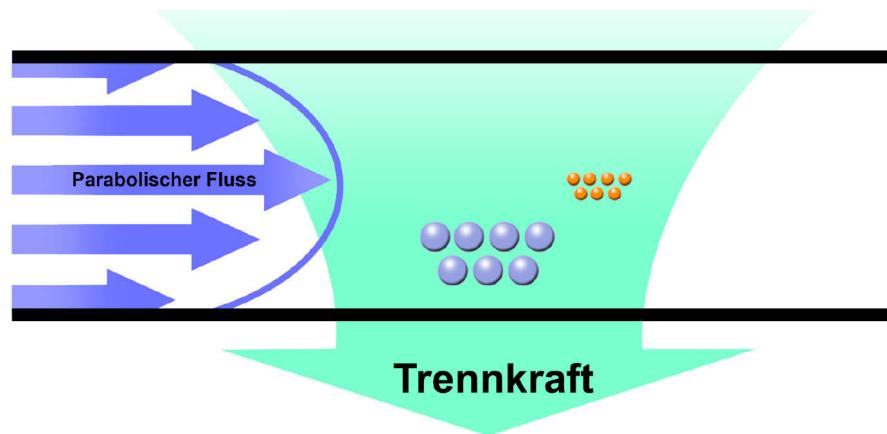


Abbildung 5: Schema des FFF-Prinzips.

Ein FFF-Experiment besteht prinzipiell immer aus drei Schritten: der Injektion, Fokussierung und Elution. Im ersten Schritt wird die Probe injiziert und durch die angelegte Trennkraft in die Richtung der Anreicherungswand gedrängt. Diesem folgt die Relaxationsphase. Hierbei stellt sich ein Gleichgewicht zwischen der angelegten Trennkraft und der Diffusion der Partikel durch die Brownsche Molekularbewegung ein. Dadurch kommt es zu einer horizontalen Auftrennung der Proben im Kanal. Schließlich wird die Probe eluiert. Die Analyten, welche durch das Trennfeld weniger weit an die Kanalunterseite bewegt wurden, befinden sich aufgrund des parabolischen Flussprofils im Bereich des höheren Flusses und eluieren somit schneller. Die Fraktionierung kann prinzipiell in zwei Elutionsmodi erfolgen, dem Brownschen Modus und dem sterischen Modus. Im Brownschen Modus wird die Elutionsreihenfolge, wie zuvor beschrieben, durch den Diffusionskoeffizienten der Probe bestimmt. Der sterische Modus beschreibt die Elution sehr großer Partikel (ab etwa  $> 1 \mu\text{m}$ ). Diese befinden sich aufgrund ihrer Größe zum Teil auch in dem Bereich des schnelleren Flusses und eluieren somit schneller als kleinere Partikel. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich im Brownschen Bereich gearbeitet, daher wird im Folgenden nur auf diesen eingegangen. Für die Analyse von NP ist die AF4 die am häufigsten verwendete FFF-Technik. [95]

#### 3.4.1.2 *Asymmetrische Fluss-Feldflussfraktionierung (AF4)*

Die AF4 wurde 1987 von Wahlund *et al.* vorgestellt. [96] Die Fraktionierung erfolgt in einem Kanal, welcher aus einer oberen, nicht durchlässigen Platte, einem Abstandshalter (engl. *spacer*), einer Membran und einer durchlässigen Keramikfritte besteht. Der zumeist trapezoid-

förmige Spacer bestimmt die Höhe des Trennkanals. Kommerziell sind Membranen aus unterschiedlichen Materialien wie regenerierte Cellulose, Polyethersulfon, Cellulosetriacetat und Polyvinylidenfluorid mit unterschiedlichen Porenausschlussgrenzen erhältlich. In Abbildung 6 ist eine schematische Darstellung des Kanalaufbaus gezeigt.

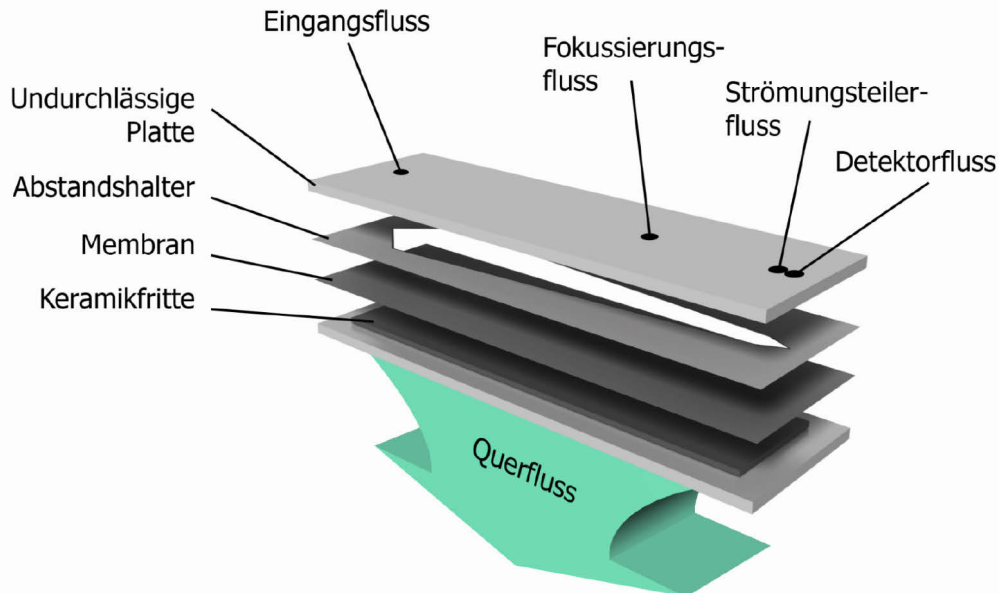


Abbildung 6: Aufbau eines typischen AF4-Kanals.

In der AF4 wird ein Teil des Kanalfusses, ein sogenannter Querfluss (QF), durch die Membran und die durchlässige Keramikfritte an der Unterseite des Kanals abgepumpt. Dadurch wird der Analyt in Richtung der Membran, der Anreicherungswand gedrängt, und es entsteht ein Konzentrationsgradient. Dicht an der Membran befindet sich somit die höchste Konzentration an Analyten. Basierend auf der Brownschen Molekularbewegung diffundieren die Analyten im Trägerfluss. Mit einem konstanten QF kommt es zur Ausbildung eines Gleichgewichtes der beiden Kräfte. Partikel mit dem gleichen Diffusionskoeffizienten bilden hierbei eine Partikelwolke. Folgende Gleichungen basieren auf der Annahme einer sphärischen Partikelform.

Die Konzentration  $c_x$  in Abhängigkeit des Abstandes  $x$  von der Membran beschreibt Gleichung 12.

$$c_x = c_0 \cdot \exp\left(-\frac{x}{l}\right) \quad (12)$$

mit

$c_0$  = Konzentration an der Membran,  $l$  = mittlere Schichtdicke

Dabei kann  $l$  durch die vom QF induzierte Geschwindigkeit  $U_x$  und den Diffusionskoeffizienten oder über die Kanaldicke  $w$  beschrieben werden.

$$l = \frac{D}{U_x} = \frac{k \cdot T}{w} \quad (13)$$

Der Diffusionskoeffizient wird durch die Nernst-Einstein-Beziehung gegeben.

$$D = \frac{k \cdot T}{f} \quad (14)$$

mit

$f$  = Reibungskoeffizient

Für die Kraft  $F$  des QF ergibt sich Gleichung 15.

$$F = |U_x| \cdot f = kT \cdot \frac{|U_x|}{D} \quad (15)$$

Der Retentionsparameter  $\lambda_r$  wird mittels Gleichung 16 beschrieben.

$$\lambda_r = \frac{l}{w} = \frac{k \cdot T}{F \cdot w} \quad (16)$$

Der Volumenstrom  $V_c$  des QF durch die Oberfläche der Anreicherungswand ergibt die durch den QF induzierte Geschwindigkeit. Die Oberfläche der Anreicherungswand entspricht dem geometrischen Volumen des Kanals  $V^0$  geteilt durch die Kanaldicke.

$$U_x = \frac{V_c \cdot w}{V^0} \quad (17)$$

Durch Einsetzen von Gleichungen 15 und 16 in Gleichung 17 wird Gleichung 18 erhalten.

$$\lambda = \frac{k \cdot T \cdot V^0}{f \cdot V_c \cdot w^2} \quad (18)$$

Unter Berücksichtigung der Stokesschen Gleichung 19

$$f = 3 \cdot \pi \cdot \eta_0 \cdot d_H \quad (19)$$

ergibt sich aus Gleichung 18 die Stokes-Einstein-Beziehung, aus welcher der hydrodynamische Durchmesser des Partikels ermittelt werden kann.

$$d_H = \frac{k \cdot T}{3 \cdot \pi \cdot \eta_0 \cdot D} \quad (20)$$

Aus dem experimentell bestimmten Retentionsvolumen  $V_r$  lässt sich der Retentionsparameter  $\lambda_r$  mit Gleichung 21 berechnen.

$$R_v = \frac{V_0}{V_r} = 6 \cdot \lambda_r \cdot \left( \coth \frac{1}{2\lambda_r} - 2\lambda_r \right) \quad (21)$$

mit

$R_v$  = Retentionsverhältnis

Für sehr kleine  $\lambda_r < 0,02$  kann der Retentionsparameter zu

$$R_v = 6 \cdot \lambda_r \quad (22)$$

vereinfacht werden.

Durch Einsetzen von Gleichungen 14 und 18 sowie die Berechnung des Retentionsverhältnisses über die Retentionszeit eines nicht-retardierte Analyten  $t_0$  und eines retardierten Analyten  $t_r$  mittels Gleichung 23

$$R_v = \frac{t_0}{t_r} \quad (23)$$

ergibt sich aus Gleichung 21 die Gleichung 24.

$$D = \frac{t_0 \cdot V_c \cdot w^2}{6 \cdot V^0} \cdot \frac{1}{t_r} \quad (24)$$

Aus der experimentell ermittelten Retentionszeit kann, nach Einsetzen der Stokesschen Gleichung (Gleichung 19), der hydrodynamische Durchmesser berechnet werden.

$$d_H = \frac{\pi \cdot \eta_0 \cdot w^2 \cdot V_c}{2 \cdot k \cdot T \cdot V} \cdot t_r \quad (25)$$

Die Trennung basiert im Brownschen Modus auf dem Diffusionskoeffizienten (bzw. im sterischen Modus auf dem sterischen Effekte) der untersuchten Partikel und dem angelegten Trennfeld. Je nach Höhe des Spacers und der Porenausschlussgrenze der Membran liegt der Trennbereich dadurch im Bereich von circa (ca.) 1 nm und 50  $\mu\text{m}$ . Zwischen etwa 1-1000 nm erfolgt eine Elution im Brownschen Modus und zwischen ca. 1-50  $\mu\text{m}$  im sterischen Modus. Durch den großen Trennbereich und das Fehlen einer stationären Phase, ist die AF4 ein vielseitiges Trennverfahren, welches bereits für unterschiedlichste Proben wie Polymere [97, 98], biologische Proben [99-101] und Partikel [27, 102, 103] angewandt wurde. [95, 102, 104]

Eine Besonderheit der hier verwendeten AF4 ist der sogenannte Strömungsteiler (ST, engl. *slot-outlet*). Hierbei wird der obere Teil des Kanalfusses über eine Kapillare abgeleitet. Da die Trennung der Analyten idealerweise lediglich in den unteren 10% der Kanaldicke stattfindet [105], sollte der Bereich des Flusses darüber keinen Analyten enthalten. Das Volumen des Strömungsteilerflusses (STF) kann manuell über eine Kapillare oder mit einer Pumpe reguliert werden. Durch die Abtrennung des reinen Eluenten ist somit eine Aufkonzentrierung der Probenbestandteile und eine höhere Empfindlichkeit möglich. [106]

Eine weiteres vielversprechendes FFF-Verfahren stellt die HF5 dar, auf welche im Folgenden eingegangen wird.

#### 3.4.1.3 *Hohlfaser-Fluss-Feldflussfraktionierung*

Die Trennung in einer hohlen Faser (HF) ohne stationäre Phase wurde erstmals 1974 von Lee *et al.* vorgeschlagen. [107] Dabei wird keine flache Membran wie in der AF4, sondern eine Membran in Form einer hohlen Faser verwendet, wodurch ein Ultrafiltrationseffekt entsteht. Die Membran ist hierbei von einer Glasfaser oder Kunststoffhülle umgeben, an welche eine QF-Pumpe angeschlossen ist. Dadurch entsteht in dem Raum zwischen Membran und Hülle ein leichter Unterdruck. In den Arbeiten von Lee *et al.* [107] wurde die Diffusion von Molekülen durch die Poren der Membran als passives Trennfeld verwendet. Jönsson *et al.* [108] stellten erstmal die Verwendung einer Pumpe vor, um die Trennkraft z.B. mit einem Gradienten abnehmen zu lassen.

Das Trennprinzip der HF5 ist dem der AF4 sehr ähnlich. Wie in der AF4 kommt es durch den Flüssigkeitsstrom in der Faser zur Ausbildung eines laminaren, parabolischen Flussprofils. Während es in der AF4 zur Ausbildung von Analytwolken kommt, bilden sich in der HF5, aufgrund des radialen Feldes, Analytringe. Die Vorteile der HF5 sind die erforderlichen geringeren Volumina für den Trägerfluss und QF, wie auch für die Probe. Aufgrund der geringeren Probenmenge eignet sich dieses Verfahren besonders für die Kombination mit empfindlichen Detektionsverfahren. [109] Abbildung 7 zeigt eine schematische Darstellung einer Trennung mittels Hohlfaser.

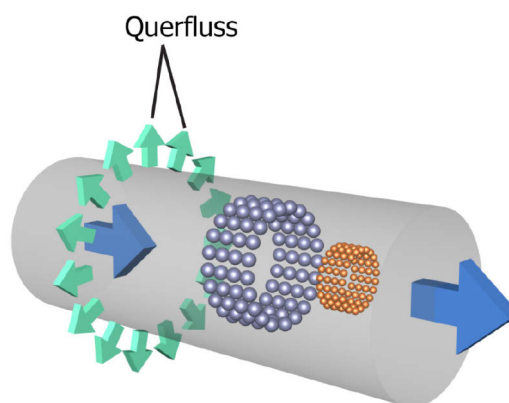


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Trennung mittels Hohlfaser.

Die theoretischen Grundlagen, besonders für den Einsatz eines QF-Gradienten gehen auf Arbeiten von Jönsson und Carlshaf [108, 110] sowie Wijnhoven *et al.* zurück [111]. Diese Theorien haben Lee *et al.* 1999 schließlich zusammengefasst. [112] Darin beschreiben sie die Retention in der HF5 durch die Péclet-Zahl  $Pé$ .



$$Pé = \frac{U(r_f, z) \cdot r_f}{D} = \frac{1}{\lambda} \quad (26)$$

mit

$U$  = radiale Fließgeschwindigkeit an der Membranwand,  $r_f$  = Faserradius,  $r_f, z$  = Faserradius entlang der  $z$ -Achse

Für den Retentionsparameter kann bei hoher Retention die vereinfachte Form in Gleichung 27 verwendet werden.

$$R_v = 4 \cdot \lambda_r, \text{ wenn } \lambda_r < 0,02 \quad (27)$$

Für Gleichung 27 wird angenommen, dass die Péclet-Zahl über die Faserlänge konstant ist. Unter Verwendung von Gleichungen 23 und 25 ergibt sich die Retentionszeit der HF. Eine genaue Herleitung hierfür findet sich bei Lee *et al.* [112]

$$t_r = \frac{t^0}{4 \cdot \lambda} = \frac{r_f^2}{8 \cdot D} \ln \frac{V_{\text{Ein}}}{V_{\text{Aus}}} \quad (28)$$

mit

$V_{\text{Ein}}$  = volumetrische Flussrate am Fasereingang,  $V_{\text{Aus}}$  = volumetrische Flussrate am Faserausgang

Durch Einsetzen von Gleichung 14 und 19 kann aus Gleichung 28 der hydrodynamische Durchmesser berechnet werden. [112]

Die HF5 wurde bereits erfolgreich für die Fraktionierung von Polymeren [108, 111, 113] und Proteinen [114-116] verwendet. Die Anwendung von HF für die Analyse von Ag-NP zeigt ebenfalls erste vielversprechende Ergebnisse. [26, 117, 118]

### 3.4.2 Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Je nach Porenausschlussgrenze kann es zu Verlusten von kleinen Probenbestandteilen mittels FFF kommen. Um dieses zu vermeiden, kann die HPLC zur Trennung von NP verwendet werden. Die HPLC ist ein chromatographisches Trennverfahren für flüssige Proben und kann u.a. für organische und biologische Moleküle sowie Polymere verwendet werden. Erste Methoden zur Trennung von NP und ihren korrespondierenden Ionen wurden bereits erfolgreich entwickelt. [23, 24, 34, 35]

In der HPLC werden die mobile und stationäre Phase unterschieden. Die stationäre Phase beschreibt das poröse Säulenmaterial. Durch diese fließt eine mobile Phase, welche die Analytmoleküle transportiert. Je nach Art der stationären Phase erfolgt dabei die Trennung nach

Größe (Ausschluss) bzw. nach der Wechselwirkung zwischen Analyt und Eluenten bzw. der stationären Phase (Säule). [58]

#### 3.4.2.1 *Größenausschlusschromatographie*

In der Größenausschlusschromatographie (auch Gelpermeationschromatographie [GPC]) werden Moleküle nach ihrem effektiven Volumen oder ihrer Größe getrennt. Unter der effektiven Größe wird hierbei der hydrodynamische Radius, welcher auch als Stokessche Radius bekannt ist, verstanden. In Abbildung 8 ist die Analyttrennung schematisch dargestellt.

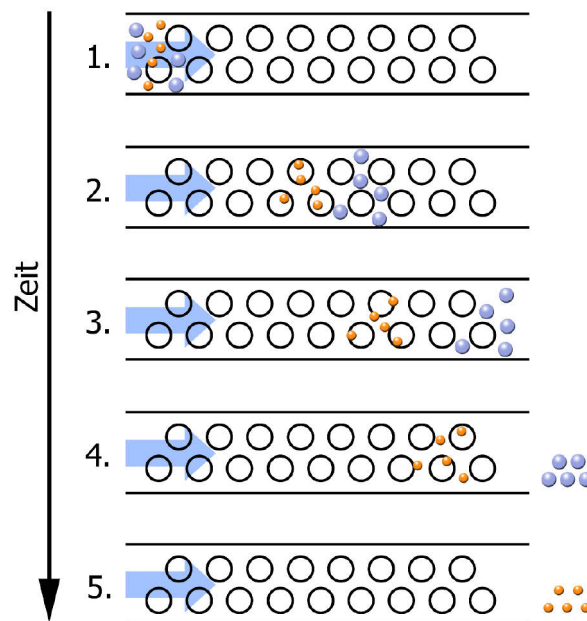


Abbildung 8: Schematische Darstellung einer Trennung von kleinen (orange) und großen (blau) Analytmolekülen. 1.: Injektion, 2. und 3.: Trennung nach effektiver Größe, 4. und 5.: Elution der größeren (D) und kleineren (E) Analyten.

Die stationäre Phase in der GPC besteht aus porösen Partikeln mit einer definierten Partikel- und Porengröße. Die Poren sind hydrophil und relativ groß (z.B. 100 nm). Charakteristisch für die GPC ist, dass idealerweise keinerlei Interaktionen zwischen der stationären Phase und dem Analyten stattfinden. Durch eine entsprechende Anpassung der mobilen Phase zur Eliminierung von Interaktionen zwischen dem Analyten und der stationären Phase kann theoretisch jede Säule für GPC-Experimente verwendet werden, wenn sie über Poren geeigneter Größe verfügt. Die mobile Phase besteht zumeist aus einem wässrigen Puffer, und die Trennung erfolgt isokratisch. Von besonderer Bedeutung sind zwei Eigenschaften der GPC-Säule: das Ausschlussvolumen, welches das Flüssigkeitsvolumen zwischen den Partikeln der stationären Phase beschreibt, und das Einschlussvolumen, auch Permeationsvolumen genannt, welches sich innerhalb der Poren befindet. Das eigentliche Trennprinzip beruht auf der

unterschiedlichen Permeation der Analytmoleküle in die Poren. Große Moleküle, welche nicht in die Poren der stationären Phase diffundieren können, werden nicht retardiert und eluieren mit dem Ausschlussvolumen. Moleküle mit einer kleineren Größe als die Poren können je nach Größe unterschiedlich in diese eindringen und werden demzufolge unterschiedlich retardiert. Sehr kleine Moleküle können wiederum in alle Poren diffundieren, werden sehr stark retardiert und eluieren erst bei sehr hohen Retentionszeiten mit dem Einschlussvolumen.

Die GPC ist ein relatives Trennverfahren. Durch die Analyse von engverteilten Standards mit bekannter effektiver Größe und über die Berechnung des spezifischen Verteilungskoeffizienten  $K_{av}$  kann eine Größenkalibriergerade erstellt werden. Dieses ist in Gleichung 29 wiedergegeben.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_s - V_0} \quad (29)$$

mit

$V_e = t_R \cdot r_H$  = Analyt-spezifisches Elutionsvolumen,  $r_H$  = hydrodynamischer Radius,  $V_0$  = Ausschlussvolumen,  $V_s$  = Säulenvolumen

Eine halb-logarithmische Auftragung des hydrodynamischen Radius oder Molekulargewichtes gegen den spezifischen Verteilungskoeffizienten resultiert in einer Sigmoidfunktion. Daraus kann im Folgenden die Größe unbekannter Analytmoleküle bestimmt werden. Wichtig ist hierbei, dass alle Moleküle eine sphärische Struktur aufweisen. [58, 119]

#### 3.4.2.2 *Umkehrphasenchromatographie*

Die Umkehrphasenchromatographie (UPC) kombiniert zumeist unpolare Säulenmaterialien mit polaren mobilen Phasen. Oftmals besteht die stationäre Phase aus einem porösen Kieselgel. Porengrößen zwischen 5-400 nm und Partikelgrößen zwischen 3-10  $\mu\text{m}$  sind charakteristisch. Die Oberfläche der Silikapartikel ist dabei durch Alkylgruppen modifiziert. Diese weisen zumeist Kettenlängen von acht (C8) oder 18 (C18) Kohlenstoffatomen auf. Aufgrund sterischer Effekte sind die Oberflächen der Silikapartikel maximal zu 50% funktionalisiert. Die somit verbleibenden Silanolgruppen des Kieselgels sorgen für einen leicht polaren Charakter des Säulenmaterials, welcher mit steigender Alkylkettenlänge ab- und mit steigender Partikelgröße zunimmt. Um die hydrophilen Gruppen weiter zu reduzieren, werden einige Säulen einem zweiten Silanisierungsschritt, einer sogenannten Nachsilanisierung z.B. mit Hexamethyldisilazan unterzogen. Kieselgel-Säulen sind in einem Bereich zwischen pH 2-8 stabil. Neben Kieselgelphasen können auch hydrophobe Polymere als stationäre Phase verwendet werden. Diese sind über einen pH-Wert zwischen 2-14 stabil, zeigen jedoch eine geringere Auflösung als Kieselgel-Säulen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine hydrophobe, C18 funktionalisierte Phase

verwendet, welche durch den Rest an nicht-funktionalisierten Silanolgruppen schwach polar war.

Das Trennprinzip beruht auf einer stärkeren Retardierung der Analyten mit steigender Hydrophobizität. Die mobile Phase besteht zumeist aus einem Gemisch aus Acetonitril oder Methanol mit Wasser oder einer Pufferlösung. Es kann isokratisch oder mit einem Gradienten eluiert werden. Je höher der Wassergehalt ist, desto langsamer wird das Analytmolekül eluiert. [120, 121]

Die Detektion der mit den zuvor beschriebenen Verfahren getrennten Probe erfolgt durch geeignete Detektoren, die auf verschiedenen Prinzipien beruhen. Neben massenspektrometrischen Verfahren (z.B. ICP-MS) kommt häufig die UV/Vis-, Fluoreszenz-, DLS-, Mehrwinkel-Lichtstreuung-, Viskositäts- oder Brechungsindexdetektion zum Einsatz. Hier wurden das ICP-MS und ein UV/Vis-Detektor verwendet.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen, basierend auf der von Soto-Alvaredo *et al.* entwickelten HPLC-ICP-MS-Methode zur Trennung von Ag-NP und Ag<sup>+</sup>-Ionen [24], eine geeignete Quantifizierungsmethoden entwickelt werden sowie der Trennmechanismus aufgeklärt werden.

### 3.5 Massenspektrometrie mit dem induktiv gekoppelten Plasma (ICP-MS)

Die ICP-MS ist ein hochleistungsfähiges Analysenverfahren zur Multi-Element-Detektion. Es zeichnet sich durch einen großen linearen, dynamischen Messbereich über sechs Größenordnungen und Nachweisgrenzen im ng-pg L<sup>-1</sup> Bereich aus. [58, 122] Der schematische Aufbau eines typischen Quadrupol-ICP-MS (ICP-Q-MS) ist in Abbildung 9 dargestellt.

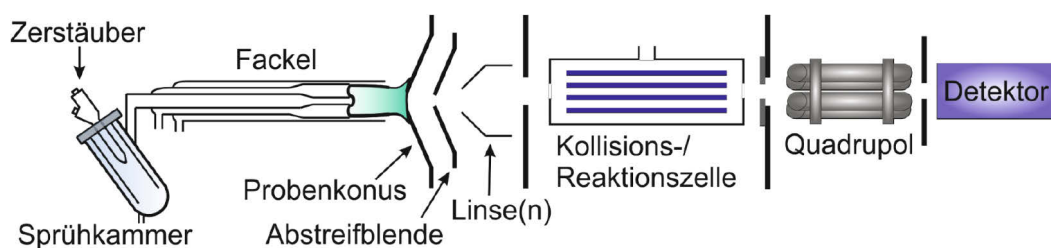


Abbildung 9: Schematische Darstellung eines ICP-Q-MS-Aufbaus.

Eine flüssige Probe gelangt über eine Pumpe zu einem Zerstäuber. Dort wird mithilfe von Argon-Gas ein feines Proben-aerosol erzeugt. Ein Teil des feinen Probennebel wird über eine Zerstäuber-kammer und die Plasmafackel in das Plasma geleitet. Die Plasmafackel besteht aus drei konzentrischen Quarzröhren. Das äußere Rohr wird tangential durch das Plasmagas mit einer Flussrate von etwa 15 L min<sup>-1</sup> durchflossen, welches sowohl das Plasma bildet und das

Quarzrohr kühlt. [123] Durch das mittlere Rohr fließt das Hilfsgas mit  $0,5\text{--}1\text{ L min}^{-1}$ , das zur Plasmabildung und -positionierung beiträgt sowie dieses stabilisiert. Der Analyt wird durch das Trägergas mit ca.  $1\text{ L min}^{-1}$  im inneren Rohr dem Plasma als Aerosol zugeführt. Typischerweise wird für die genannten Gasflüsse Ar verwendet.

Als Plasma wird ein partiell ionisiertes Gas bezeichnet. Dieses besteht aus einem Gemisch aus Molekülen, Atomen, Radikalen, Ionen und freien Elektronen. Der schematische Aufbau einer Plasmafackel ist in Abbildung 10 wiedergegeben. Das Plasma wird durch ein elektromagnetisches Feld an einer Hochfrequenz-Spule in einem tangentialen Gasfluss erzeugt. An die Spule wird ein Hochfrequenz-Generator mit einer Frequenz von zumeist 27 MHz und einer Leistung zwischen 750-1500 W angeschlossen, welcher einen Wechselstrom in der Spule erzeugt. Dieses führt zur Bildung eines hochfrequenten elektromagnetischen Feldes. Ein Tesla-Funken zündet das Plasma. Hierbei wird ein Teil des Gases ionisiert. Die dabei freigewordenen Elektronen kollidieren mit weiteren Ar-Atomen und erzeugen weitere Elektronen. Durch das dauerhaft angelegte elektromagnetische Feld wird das Plasma bei Atmosphärendruck aufrechterhalten.

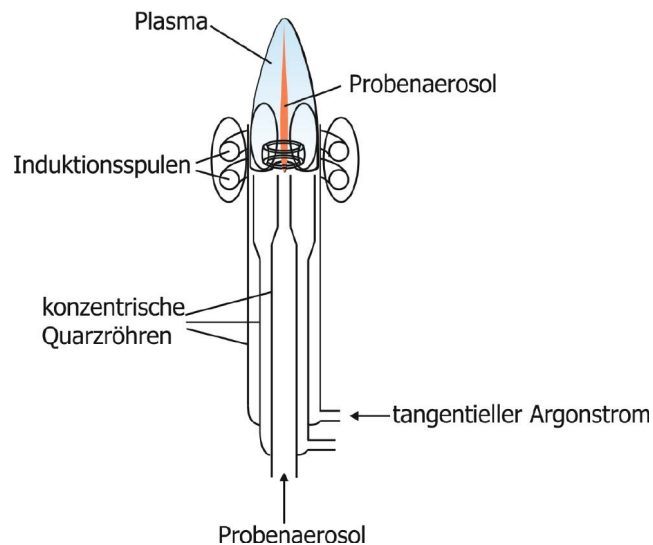


Abbildung 10: Schematischer Aufbau einer Plasmafackel nach Fassel.

Im Plasma wird der Analyt aufgrund der hohen vorherrschenden Temperaturen von  $6000\text{--}10000\text{ °K}$  zunächst getrocknet, verdampft, atomisiert und schließlich ionisiert. Durch einen Unterdruck werden die Ionen ins Interface gesaugt. Dieses besteht aus zwei wassergekühlten Blenden. Die erste Blende, die sogenannte Probenblende (engl. *sampler*), hat eine Öffnung mit einem Durchmesser von etwa 1 mm. Durch diese gelangen die Ionen in das Vorvakuum. Hinter der Probenblende befindet sich die Abstreifblende (engl. *skimmer*) mit einem Durchmesser von etwa 0,5 mm. Anschließend werden die Ionen durch die Extraktionslinse fokussiert und gelangen in die Ionenoptik. Diese besteht aus einer oder mehreren Linsen, welche die Ionen mithilfe eines elektrischen Feldes bündeln und fokussieren. Durch eine

Ablenkung des Ionenstroms oder eine Metallplatte hinter der Abstreifblende werden neutrale Teilchen und Photonen aus dem Ionenstrom entfernt.

Viele ICP-Q-MS-Geräte besitzen eine Kollisions-/Reaktionszelle, in welche die Ionen im nächsten Schritt geleitet werden. Diese dient zur Eliminierung von doppeltgeladenen Ionen, Oxiden der Elemente und den sogenannten, polyatomaren, spektralen Interferenzen. Unter polyatomaren Interferenzen werden Moleküle, welche aus zwei oder mehreren atomaren Ionen bestehen, verstanden. Diese haben das gleiche nominale Masse-zu-Ladung( $m/z$ )-Verhältnis wie der Analyt und können somit nicht vom Analyten unterschieden werden. Polyatomare Spezies (wie z.B.  $^{14}\text{N}+^{93}\text{Nb}$  auf der Masse 107 oder  $^{40}\text{Ar}+^{69}\text{Ga}$  auf der Masse 109) können durch die Reaktion der Ionen mit dem Plasmagas, der Matrix oder dem Lösungsmittel entstehen. Die aus einem Quadrupol mit Metallstäben bestehende Zelle zur Reduktion polyatomarer Interferenzen kann im Reaktionsmodus oder im Kollisionsmodus betrieben werden. An ihr ist ein hochfrequentes elektromagnetisches Feld mit Wechselspannung angelegt. Im Kollisionsmodus werden Stoßgase, wie z.B. He zugeführt, welche zu einer Dissoziation der polyatomaren Interferenzen führen können. Im Reaktionsmodus werden Reaktionsgase, wie z.B.  $\text{H}_2$  eingeleitet. Die polyatomaren Spezies können dabei durch Protonen-, Wasserstoff- oder Ladungstransfer beseitigt werden. Anschließend gelangen die Ionen in den Massenanalysator. [58, 124, 125]

#### 3.5.1 Quadrupol-Massenspektrometer

Im Q-MS werden die Ionen nach ihrem  $m/z$ -Verhältnis getrennt. Der Massenfilter besteht aus vier konzentrisch zueinander angeordneten, zylindrischen oder hyperbolischen Metallstäben. Diese haben die gleiche Länge und Durchmesser und bestehen oft aus Edelstahl oder Molybdän. Der Aufbau eines Q-MS ist in Abbildung 11 dargestellt.

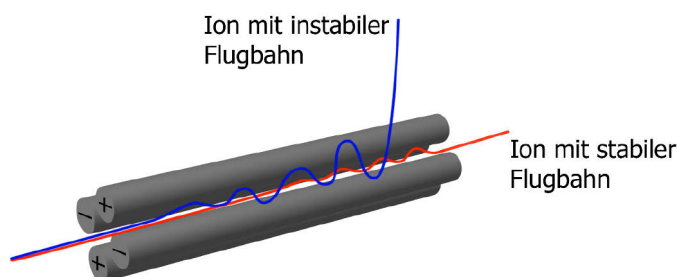


Abbildung 11: Aufbau eines Q-MS.

An den Stäben liegt eine Gleichspannung an. Die jeweils gegenüberliegenden Stäbe haben dabei die gleiche Polung, sodass benachbarte Stäbe unterschiedliche Polungen aufweisen. Die Gleichspannung wird von einer variablen Wechselspannung überlagert. Das Verhältnis zwischen Gleich- und Wechselspannung der Stabpaare beeinflusst, welche Ionen mit welchem

$m/z$ -Verhältnis den Massenfiter passieren können. Das angelegte Hochfrequenzfeld bringt die gewählten Ionen dabei auf eine stabile Flugbahn in Richtung des Detektors. Ionen mit anderen  $m/z$ -Verhältnissen haben eine instabile Flugbahn und werden aus dem Massenfiter herausgeschleudert. Nach der Detektion eines bestimmten Ions kann der Massenfiter auf ein anderes Gleich- zu Wechselspannungsverhältnis umschalten und somit Ionen mit einem anderen Masse-zu-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) in Richtung Detektor leiten. Dieser sequentielle Vorgang wird auch als Scan-Modus bezeichnet.

Neben dem Q-MS können auch andere Massenfiter eingesetzt werden, wie z.B. ein Flugzeit-Massenanalysator oder ein hochauflösendes Massenspektrometer mit magnetischem Sektorfeld. Aufgrund seines geringen Preises, seiner vergleichsweise hohen Auflösung und relativ einfachen Handhabung ist das Q-MS jedoch am weitesten verbreitet und wurde im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

Nach der Trennung der Ionen entsprechend ihrem  $m/z$ -Verhältnis werden diese oftmals mittels eines Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) detektiert. In Abbildung 12 ist das Prinzip eines SEV-Detektors gezeigt.

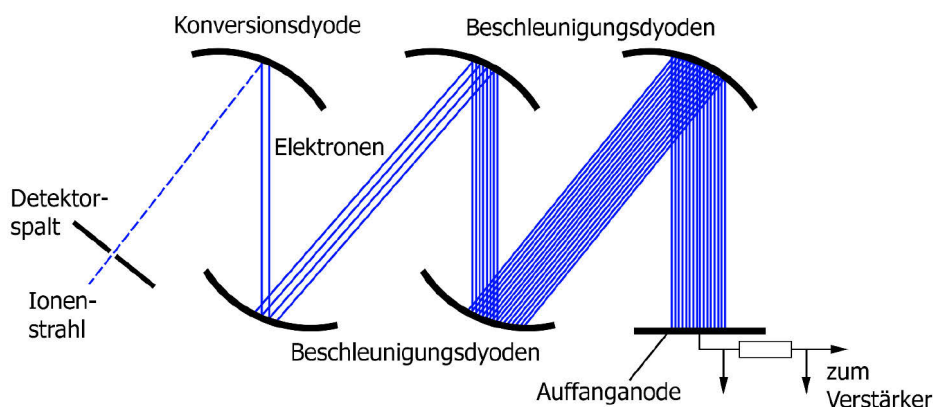


Abbildung 12: Schematische Darstellung eines SEV-Detektors.

Das Kation trifft im SEV auf die erste Konversationsdynode. Dort liegt eine hohe negative Ladung an, wodurch 2-3 Elektronen abgegeben werden. Diese treffen auf eine weitere Dynode, wo erneut mehrere Elektronen emittiert werden. Durch weitere Dynoden kommt es zu einer Elektronenkaskade und somit zu einer Vervielfachung. Zur Abdeckung des charakteristischen, großen, linearen dynamischen Bereichs des ICP-MS kann der Detektor im Puls- oder Analog-Modus betrieben werden. Der Puls-Modus wird für geringe Analytkonzentrationen verwendet und ist in Abbildung 12 dargestellt. Der Analog-Modus wird für hohe Konzentrationen verwendet. Dabei wird das Signal an einer Dyode im mittleren Bereich des Detektors gemessen. Eine entsprechende Detektor-Kalibrierung (engl. *cross calibration*) normiert die

Signale der beiden Modi, sodass diese jeweils als Impulse pro Sekunde (engl. *counts per second*) angegeben werden können. [58, 125]

#### 3.5.2 Probeneintrag

Das Probeneintragssystem hat einen hohen Einfluss auf die Empfindlichkeit und die Transporteffizienz, auf welche in Kapitel 3.6.4 genauer eingegangen wird. [79]

##### 3.5.2.1 *Pneumatische Zerstäubung*

Die in Kombination mit dem ICP am weitesten verbreiteten Systeme beruhen auf der pneumatischen Zerstäubung. Darunter versteht man zumeist den konzentrischen Zerstäuber, wie den Meinhard-Zerstäuber, welcher in Abbildung 13 schematisch dargestellt ist, oder den Knierohr-Zerstäuber.

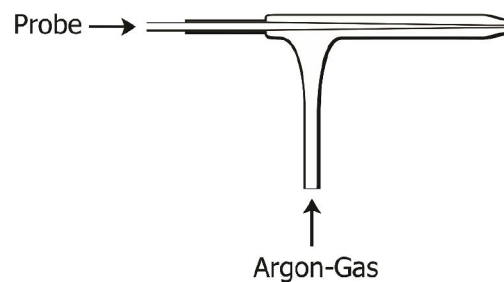


Abbildung 13: Schematische Darstellung eines konzentrischen Zerstäubers.

In dieser Arbeit wurde ein Meinhard-Zerstäuber verwendet. Hierbei wird die Probe mit einem Fluss von etwa  $0,3\text{--}0,4\text{ mL min}^{-1}$  über eine dünne Kapillare zugeführt. Diese ist konzentrisch von einem Ar-Gasstrom mit einem Volumen von ca.  $1\text{ L min}^{-1}$  umgeben. Die Kapillare zur Probenzufuhr verengt sich bis zur Spitze. Durch den schnellen Fluss des Ar-Gases und dem im Vergleich dazu geringen Druck der Probe wird diese aus dem Zerstäuber herausgesogen (Venturi Effekt). Da das Ar-Gas beim Verlassen der inneren Kapillare stark expandiert, reißt es feine Tröpfchen der Probenflüssigkeit mit und erzeugt so ein Aerosol. Die Vorteile dieser Geometrie liegen in der hohen Empfindlichkeit und Stabilität. Der Nachteil besteht insbesondere darin, dass die feine Kapillarspitze jedoch leicht verstopfen kann. Als Material können sowohl Borsilikatglas, Quarz oder Polymer-basierte Materialien, wie Perfluoralkoxyalkane (PFA), dienen. Konzentrische Zerstäuber können selbst-ansaugend oder mit einer Pumpe betrieben werden. Letzteres ermöglicht die Einstellung und Variation der Fließgeschwindigkeit. [126, 127]



### 3.5.2.2 *Sprühkammern*

Die Funktion einer Sprühkammer ist es, größere Tröpfchen ( $\geq 10 \mu\text{m}$ ) des Aerosols abzuscheiden und Signalschwankungen auszugleichen. Am weitesten verbreitet sind die zyklonische, die Scott- und die konische Sprühkammer. Das generelle Prinzip beruht darauf, dass größere Tröpfchen eine größere Trägheit als kleinere Tröpfchen haben. Somit können diese der Umlenkung des Zerstäubergases nicht folgen und verbleiben an der Wandung der Sprühkammer. Im Rahmen dieser Arbeit wurden eine zyklonische und eine konische Zerstäuber-kammer verwendet.

In der zyklonischen Sprühkammer beruht dieser Effekt auf der Zentrifugalkraft. Das Aerosol wird tangential zu einem Ar-Gasstrom eingeleitet und erzeugt einen nach unten gerichteten Wirbel. In der doppelwandigen, zyklonischen Sprühkammer wird im unteren Bereich der Sprühkammer die Richtung des Aerosols geändert. Größere, träge Tröpfchen können dem Aerosolstrom nicht mehr folgen und werden gegen die Wand der Sprühkammer geschleudert, während kleinere Tröpfchen durch ein Ausgangsrohr mit kleinerem Durchmesser nach oben zum Plasma geführt werden. Die abgetrennten, größeren Tröpfchen werden im unteren Teil über einen Abfluss aus der Kammer entfernt. Ein Foto der im Rahmen dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten zyklonischen Sprühkammer ist in Abbildung 14 dargestellt.



Abbildung 14: Zyklonische Sprühkammer.

In der konischen Sprühkammer wird das Aerosol auf eine sogenannte Prallkugel gelenkt. Dabei werden die größeren von den kleineren Tröpfchen getrennt. Während größere Tröpfchen auf die Prallkugel treffen und aufgrund der Gravitationskraft nach unten fallen, werden kleinere Tröpfchen mithilfe des Zerstäubergases zum Plasma gelenkt.

Durch die Verwendung einer Pumpe kann es darüber hinaus zu Signalschwankungen durch den gepulsten Eintrag des Aerosols in die Sprühkammer und somit zu Dichteschwankungen kommen. Diese können ein Funkelrauschen (engl. *flicker noise*) im Plasma erzeugen. Darüber hinaus ist die Geometrie der Kammer, insbesondere die Anordnung des Aerosol-ausgangs und des Ablaufes, bedeutend, um Signalschwankungen zu minimieren. Die Kühlung der Sprühkammern kann eingesetzt werden, um die Stabilität des Signals zu verbessern.

Weitere Vorteile bestehen darin, dass damit der Oxidgehalt und die Menge an eingetragenen Lösungsmittel reduziert werden können. Letzteres trifft vor allem für die Verwendung von organischen Lösungsmitteln zu. [125, 126]

#### 3.5.2.3 *Laserablation*

Die Laserablation (LA) ist ein Probeneintragsverfahren für feste Proben. Die Kombination der LA und der ICP-MS (LA-ICP-MS) wurde erstmals 1985 von Gray *et al.* beschrieben. [128] Dabei wird ein gepulster Laserstrahl mit ns-Pulsdauer, einer Energie von etwa 1-4 mJ und einer Bestrahlungsstärke von 1-100 GW cm<sup>-2</sup> bei atmosphärischem Druck mittels einer Optik auf die Probenoberfläche fokussiert. Die Energie des Lasers führt zur Verdampfung und Aerosolbildung einer kleinen Probenmenge, die sich, auf einem Probenhalter montiert, in einer Ablationskammer befindet. Das Aerosol wird mithilfe eines Trägergases, He oder Ar, aus der Ablationskammer zum ICP transportiert. Die NWG der LA-ICP-MS liegen im sub-ng g<sup>-1</sup> Bereich. [129] Der Vorteil dieses Verfahrens besteht in der direkten Analyse ohne vorherigen Aufschluss. Dadurch können Kontaminationen und Verluste minimiert werden.

Am häufigsten werden Festkörper-Laser, wie Neodym-dotierte Yttrium-Aluminium-Granat(Nd:YAG)-Laser verwendet. Oft finden Laser mit einer vielfachen Frequenz der Laser-Grundwellenlängen 1064 nm von 266 nm oder 213 nm Anwendung. Je nach Lasersystem sind dabei Laserspot-Durchmesser von ca. 750 µm bis zu wenigen µm möglich. Die Pulslänge des Lasers liegt meist zwischen 5-10 ns. Die LA-ICP-MS kann zur orts aufgelösten Analyse wie der Tiefen- und Oberflächenanalyse verwendet werden und stellt damit ein bildgebendes Verfahren zur Bestimmung und Visualisierung von Spurenelementen dar.

Eine große Herausforderung beim Probeneintrag bildet die Quantifizierung und interne Standardisierung, da geeignete Kalibrierstandards zumeist fehlen und eine Zugabe eines internen Standards zu einem Feststoff oftmals nicht möglich ist. Besonders für die Analyse von größeren Probenflächen mit Analysendauern von mehreren Stunden bis zu mehreren Tagen ist die Verwendung eines internen Standards aufgrund von möglichen Gerätedriften nötig. [123, 125, 130]

#### 3.5.3 **Konventionelle ICP-MS-Analyse**

Im konventionellen ICP-MS-Messbetrieb wird ein kontinuierliches Signal mit einer geringen Schwankung von wenigen Prozent aufgezeichnet. Dabei wird zwischen dem Standard- und dem zeitaufgelösten Modus unterschieden. Im Standardmodus werden die erhaltenen Signale eines Isotops während der gewählten Integrationszeit aufsummiert und der Mittelwert mehrerer dieser Massenscans gebildet. Im zeitaufgelösten Modus werden Peaks nach einer Trennung mittels FFF oder HPLC in fortlaufenden Zeitintervallen detektiert. [125]

### 3.5.4 Einzelpartikel-Analyse

Im Einzelpartikel(EP)-Modus der ICP-MS können, wie es die Bezeichnung ausdrückt, einzelne Partikel analysiert werden. Hierbei wird zeitaufgelöst ein Isotop einer hochverdünnten Probe unter Verwendung kurzer Integrationszeiten von 10 ms oder weniger detektiert. Die Vorteile der EP-ICP-MS liegen in der Einfachheit und Schnelligkeit der Analyse. Ziel ist es, in dem ausgewählten Detektionszeitraum maximal einen NP zu detektieren. Die im Plasma gebildete Ionenwolke benötigt einen Zeitraum von etwa 300-500  $\mu\text{s}$ , um vollständig detektiert zu werden. [131] Daher müssen sowohl die Verdünnung als auch die Integrationszeit so gewählt werden, dass die Anzahl an doppelten Partikeldetektionen (siehe Abbildung 15 Zeitpunkt 2) und abgeschnittenen Partikeldetektionen (siehe Abbildung 15 Zeitpunkt 3) minimiert wird. Idealerweise wechseln sich die Detektion von Partikeln (Abbildung 15 Zeitpunkt 1) und Untergrund (Abbildung 15 Zeitpunkt 4) ab. Die Dauer des Experimentes und die Verdünnung der Probe werden dabei so gewählt, dass mindestens 1000 Partikel pro Experiment gemessen werden, um eine ausreichende Statistik zu erhalten.

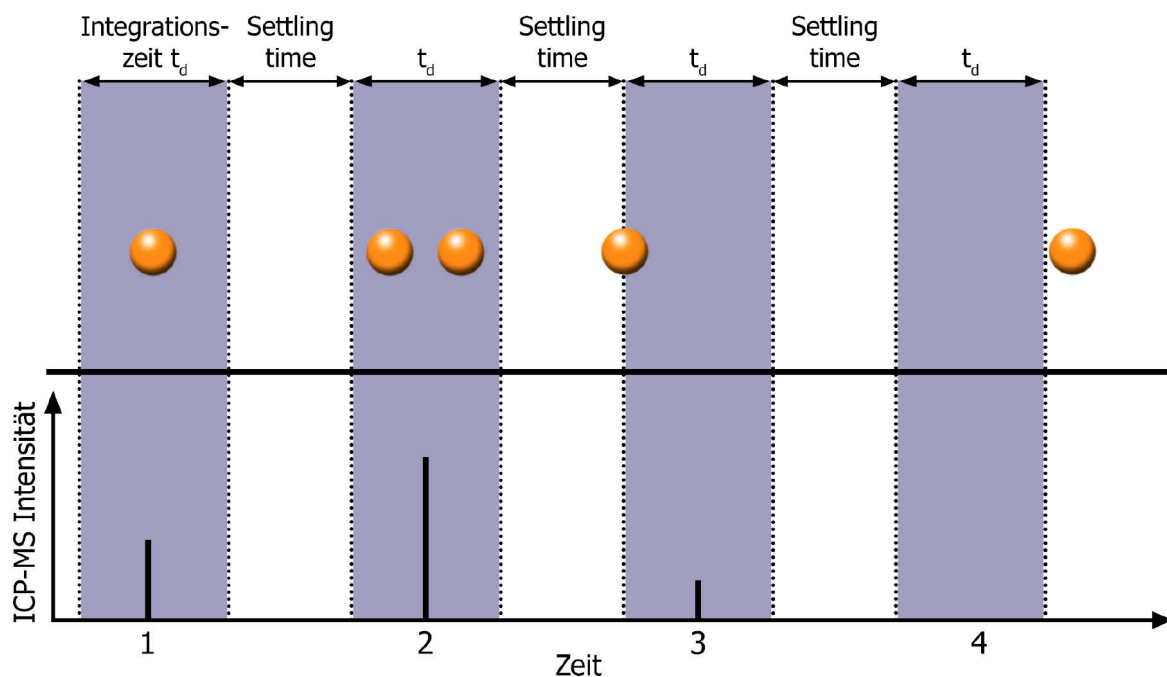


Abbildung 15: Prinzip der NP-Detektion im Einzelpartikel-Modus der ICP-MS.

Aus den EP-ICP-MS-Daten können drei Arten von Informationen gewonnen werden: (i) Aus der Intensität der Signale kann unter Annahme sphärischer NP die Partikelgröße ermittelt werden, (ii) gibt die Anzahl der Signale gibt Aufschluss über die Partikelanzahlverteilung, wenn keine Aggregation der polydispersen Kolloide vorliegt, und (iii) aus dem Untergrund kann der Anteil an gelösten, ionischen Spezies bestimmt werden.

Um die Partikelgröße und Partikelanzahlverteilung ermitteln zu können, muss berücksichtigt werden, dass lediglich ein kleiner Teil des zerstäubten Aerosols in das Plasma gelangt. Der Großteil verbleibt in der Zerstäuber- und Zerstäuberkammer. Dieser Faktor wird als Transporteffizienz bezeichnet. [131-133] Zur Bestimmung der Transporteffizienz bieten sich drei unterschiedliche Möglichkeiten an, die Partikelgrößen-Methode, die Partikelanzahl-Methode und die Abfluss-Auffang-Methode. In den ersten zwei Fällen wird ein NP-Referenzmaterial mit bekannter Größe oder bekannter Anzahl verwendet. In der letzten Methode wird das Volumen einer in das Gerät gepumpten Lösung mit dem Volumen, welches durch den Abfluss des Zerstäubers abgepumpt wird, ins Verhältnis gesetzt. Da in dieser Arbeit hauptsächlich die Partikelanzahl-Methode verwendet wurde, wird im Folgenden auf diese näher eingegangen. Die anderen beiden Methoden sind ausführlich durch Pace *et al.* beschrieben. [79] Zunächst wird die Partikelanzahlkonzentration  $N_{NP}$  eines NP-Referenzmaterials mit bekannter Konzentration und Größe mit Gleichung 30 berechnet.

$$N_{NP} = \frac{f_{NP}}{\frac{4}{3} \cdot \pi \left(\frac{d}{2}\right)^3 \cdot \rho_p} \quad (30)$$

mit

$f_{NP}$  = Partikelmassenfluss, berechnet aus der Gesamtkonzentration des NP Referenzmaterials,  
 $\rho_p$  = Partikeldichte

Aus Gleichung 31 ergibt sich die Transporteffizienz  $\eta_n$ .

$$\eta_n = \frac{f(I_{NP})}{q_{liq} \cdot N_{NP}} \quad (31)$$

mit

$f(I_{NP})$  = gemessene Pulsfrequenz,  $q_{liq}$  = Probenflussrate [79, 133]

Die Verteilung der Partikelgrößen und -anzahl wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels einer Auswertungsdatei, welche von Peters *et al.* [133] entwickelt wurde, bestimmt. Hierbei wurde zunächst die Signalverteilung eines Experimentes (Signalintensität gegen Häufigkeit) aufgetragen. Aus dieser Graphik wird visuell die Grenze zwischen Untergrundsignalen und Partikelsignalen ausgewählt. Die Signale werden dann in zwei Spalten sortiert und das Untergrundsignal vom Partikelsignal abgezogen. Aus dem Signal des Untergrundes kann der gelöste Anteil an Ionen ermittelt werden.

Durch eine Kalibriergerade mit wässrigen Standardlösungen und der zuvor bestimmten Transporteffizienz wird aus der Intensivität der erhaltenen Signale die Masse pro NP berechnet. Dafür wird aus der Kalibriergerade ein Kalibrierfaktor K ermittelt. Die Masse  $m_p$  eines einzelnen Ag-NP lässt sich aus Gleichung 32 berechnen.

$$m_p = \frac{(I_p - I_{UG}) \cdot t_d}{K} \cdot \frac{V \cdot \eta_n}{60} \quad (32)$$

mit

$I_p$ ,  $I_{UG}$  = Intensität Partikelsignal bzw. Untergrund,  $K$  = Kalibrierfaktor  $\left(\frac{\text{cps}}{\text{ng Ag}}\right)$ ,  $t_d$  = Integrationszeit

Wenn die Form des Partikels bekannt ist, kann aus der Masse des Partikels sein geometrischer Durchmesser berechnet werden. Mittels Gleichung 33 kann die Berechnung des geometrischen Durchmessers  $d_{NP}$  für sphärische NP vorgenommen werden.

$$d_{NP} = \sqrt[3]{\frac{6 \cdot m_p}{\pi \cdot \rho_p}} \quad (33)$$

Die Partikelanzahlverteilung  $c_{NP}$  kann mittels Gleichung 34 bestimmt werden.

$$c_{NP} = \frac{A_{NP}}{\eta_n} \cdot \frac{1000}{V \cdot t_A} \quad (34)$$

mit

$A_{NP}$  = Anzahl an detektierten Partikeln,  $V$  = Probenflussrate,  $t_A$  = Analysenzeit [133, 134]

Die NWG der EP-ICP-MS wurde im Rahmen dieser Arbeit nach Gschwind *et al.* [135] mithilfe einer Poissonstatistik berechnet, welche mit den Leitlinien der IUPAC übereinstimmt.

$$NWG = 3,29 \cdot \sigma_{UG} + 2,71 \quad (35)$$

mit

$\sigma_{UG}$  = Standardabweichung vom Untergrund [135]

Die so erhaltene NWG in Impulse pro Sekunde (cps) kann zur Ermittlung der NWG der Partikelgröße in Gleichungen 32 und 33 eingesetzt werden.

### 3.6 Quantifizierung des Ag-Gehaltes

Die Eigenschaften von Ag-NP können in Abhängig von der Größe und der Oberflächenbeschichtung variieren. [38, 136] Da zum derzeitigen Zeitpunkt lediglich zwei Ag-NP-Referenzmaterialien verfügbar sind, fehlt somit eine breite Basis an geeigneten Standards für die Größenkalibrierung, Methodenoptimierung und Quantifizierung über den gesamten Größenbereich und für die verschiedenen Beschichtungen (z.B. Citrat, Polyethylenglykol (PEG) oder Silika). Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher wässrige Standardlösungen zur Quantifizierung verwendet, wobei die Annahme zugrunde gelegt wurde, dass die NP im Plasma komplett atomisiert und ionisiert werden. Darüber hinaus muss sich die aus den Partikeln resultierende Ionenwolke ähnlich wie die Ionen einer wässrigen Standardlösung verhalten. [79, 137]

Zur *on-line* Quantifizierung unterschiedlichster Kopplungstechniken werden zumeist die Fließinjektionsanalyse (FIA) und die Isotopenverdünnungsanalyse (IVA) verwendet. Beide Quantifizierungsmöglichkeiten wurden im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt und werden, zusammen mit der externen Kalibration, im Folgenden erläutert.

#### 3.6.1 Externe Kalibrierung

Für die konventionelle, nicht-zeitaufgelöste ICP-MS von Flüssigkeiten wird am häufigsten die externe Kalibrierung verwendet. Hierbei wird eine Kalibrierreihe, welche aus verschiedenen Konzentrationen wässriger Standardlösungen der zu untersuchenden Analyten besteht, analysiert. Durch das Auftragen der Konzentrationen der Lösungen gegen die erhaltenen Signalintensitäten wird eine Kalibriergerade erhalten. Das Einsetzen der erhaltenen Signalintensitäten der Probe in diese Gleichung ergibt die Probenkonzentration. Ein Nachteil dieser Kalibrierart ist, dass Matrixeffekte nicht kompensiert werden können.

Weitere Möglichkeiten der Kalibrierung sind u.a. die Standardaddition, auf welche hier nicht genauer eingegangen wird, und die Isotopenverdünnung, welche in Kapitel 3.6.3 beschrieben wird. [58]

#### 3.6.2 Fließinjektionsanalyse

Die FIA zählt zu den einfachsten Quantifizierungsverfahren für Kopplungstechniken. Hierbei handelt es sich um ein 1-Punkt-Kalibrierverfahren. Über eine Injektionsschleife wird eine definierte Menge eines Standards zu einem kontinuierlichen Flüssigkeitsstrom gegeben. Dieser Flüssigkeitsstrom wird auch zum Transport des Analyten verwendet. Dabei wird die FIA vor oder nach der Elution des Analyten durchgeführt. Wie aus dem schematischen Aufbau in Abbildung 16 hervorgeht, wird die Schleife zumeist an einem 6-Wege-Ventil angeschlossen.

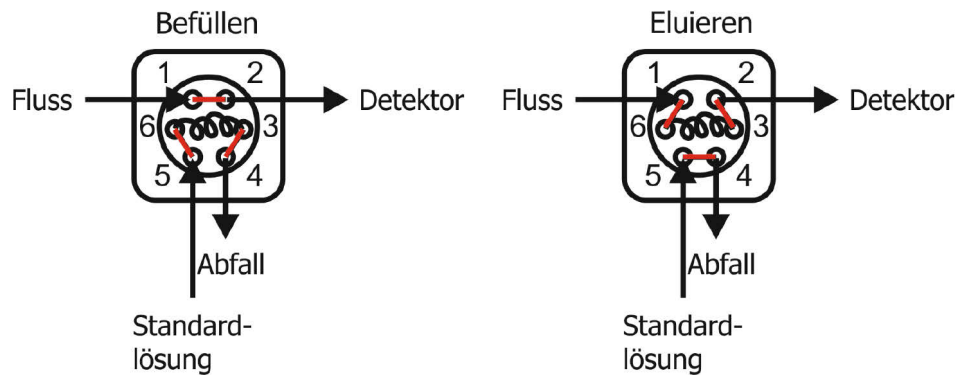


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Fließinjektionsanalyse mit einem 6-Wege-Ventil. In Rot sind die Verbindungen der Ventilpositionen beim Befüllen der Schleife mit dem Standard und beim Eluieren markiert.

Zunächst wird die Schleife mit einem Standard befüllt. Durch ein Umschalten des Ventils durchspült der (z.B. FFF- oder HPLC-)Trägerfluss die Schleife und eluiert den darin enthaltenen Standard zum Detektor. Danach wird das Ventil in die ursprüngliche Position zurückgestellt und die Schleife wird erneut befüllt. Die Vorteile einer derartigen Kalibrierung sind wiederholbare, relativ scharfe Signale des Standards. Zusätzlich wird ein interner Standard verwendet, um mögliche Geräteschwankungen, besonders bei langen Analysenzeiten, auszugleichen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die FIA für die Kalibrierung der FFF-ICP-MS-Experimente verwendet. [58, 138]

### 3.6.3 Isotopenverdünnungsanalyse

Die IVA stellt ein weiteres Kalibrierverfahren dar. Hierfür wird ein Element mit mindestens zwei stabilen bzw. langlebigen, radioaktiven Isotopen benötigt. Die Vorteile der IVA liegen darin, dass der isotopenangereicherte Standard sowohl als Kalibrier- als auch als interner Standard dient. Das Verfahren basiert auf der Analyse der Isotopenverhältnisse und ist somit unabhängig von Geräteschwankungen und Matrixeffekten. Ein Nachteil besteht darin, dass die Verwendung isotopenangereicherter Standards zumeist sehr kostenintensiv ist.

Zur Durchführung müssen sowohl die Isotopenverhältnisse der Probe und des Standards als auch die Konzentration des Standards bekannt sein oder ermittelt werden. Letztere kann durch eine inverse IVA mit einer wässrigen Standardlösung bestimmt werden. Eine definierte Menge des isotopenangereicherten Standards wird zur Probe gegeben. Dabei ist eine homogene Verteilung wichtig. Anschließend wird das Isotopenverhältnis bestimmt, woraus im nächsten Schritt die Konzentration der Probe berechnet werden kann. Das Prinzip ist in Abbildung 17 am Beispiel des Ag vereinfacht wiedergegeben.

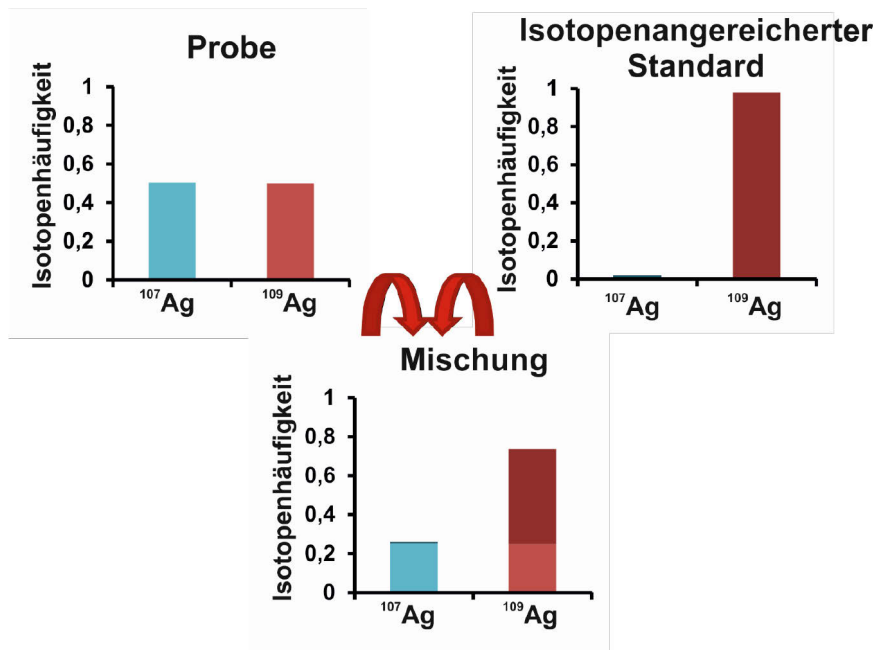


Abbildung 17: Prinzip der Isotopenverdünnungsanalyse am Beispiel von Ag.

Das Isotopenverhältnis  $R_m$  in der Mischung ergibt sich aus Gleichung 36. [139, 140]

$$R_m = \frac{N_P \cdot h_P^{109} + N_{IS} \cdot h_{IS}^{109}}{N_P \cdot h_P^{107} + N_{IS} \cdot h_{IS}^{107}} \quad (36)$$

mit

P = Probe, IS = isotopenangereicherter Standard,  $N_P$ ,  $N_{IS}$  = Stoffmenge der Probe bzw. des isotopenangereicherten Standards, h = Isotopenhäufigkeit (%)

Durch ein Umstellen von Gleichung 36 wird Gleichung 37 erhalten.

$$N_P = \frac{N_{IS} (h_{IS}^{109} - R_m \cdot h_{IS}^{107})}{R_m \cdot h_P^{107} - h_P^{109}} \quad (37)$$

Unter Verwendung von

$$N = \frac{(c \cdot m)}{M} \quad (38)$$

mit

c = Konzentration, m = Masse, M = molare Masse

ergibt sich aus Gleichung 39 die Konzentration in der Probe  $c_P$ .

$$c_P = c_{IS} \cdot \frac{m_{IS}}{m_P} \cdot \frac{M_P}{M_{IS}} \cdot \frac{h_{IS}^{109}}{h_P^{107}} \cdot \left( \frac{R_m - R_{IS}}{1 - R_m \cdot R_P} \right) \quad (39)$$

mit



$c_{IS}$  = Konzentration des isopenangereicherten Standards

In der IVA werden zwei Ansätze unterschieden, die speziesspezifische IVA und die speziesspezifische IVA. In der speziesspezifischen IVA wird ein isopenmarkiertes Molekül, welches dem Analysenmolekül in seiner Struktur, Zusammensetzung und chemischen Funktion entspricht, vor der Probenvorbereitung zu der Probe gegeben. Beide Substanzen müssen stabil sein und dürfen keine Isotope austauschen oder verlieren. Zudem müssen sich Analyt und Standard vollständig mischen. Der IVA-Standard durchläuft dieselbe Analysenprozedur, somit können Verluste ausgeglichen werden. Da speziesspezifische Standards für Ag-NP fehlen und diese in ihrem Verhalten mit unterschiedlicher Größe und Oberflächenbeschichtung stark variieren können, wurde hier die speziesspezifische IVA verwendet. Hierbei wird eine isopenangereicherte, wässrige Standardlösung verwendet, die nach der Auftrennung z.B. über eine Pumpe hinzugeführt wird. Dies ermöglicht auch die Quantifizierung des Elementgehaltes unbekannter Spezies, kann allerdings Verluste z.B. während einer Probenauftrennung mittels HPLC nicht ausgleichen. [140]

Die zeitaufgelöste speziesspezifische IVA wurde erstmals 1994 von Rottmann *et al.* beschrieben. [139] Dort findet sich auch eine ausführliche Herleitung der im Folgenden dargestellten Gleichung 40. Dabei wird zunächst das Isopenverhältnis pro Zeitintervall berechnet und der Massenfluss des Standards bestimmt. Dieser ergibt sich aus der Flussrate mal der verwendeten Konzentration pro Zeiteinheit. Anschließend wird der zeitabhängige Massenfluss  $M_{f,p}$  des Analyten mittels Gleichung 40 berechnet.

$$M_{f,p}(t) = M_{f,IS} \cdot \frac{h_{IS}^{109} - R(t) \cdot h_{IS}^{107}}{h_p^{107} \cdot R(t) - h_p^{109}} \quad (40)$$

Durch die Auftragung von  $M_p(t)$  gegen die Retentionszeit wird das Massenfluss-Chromatogramm erhalten. Die Integration der Analytsignale ergibt schließlich die absolute Elementkonzentration. [139, 141, 142]

## 4 Experimentelles

### 4.1 Chemikalien und Gase

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Reinheit	Hersteller
$^{109}\text{Ag}$ -Standard 10 mg L <sup>-1</sup> , isotopenangereichert	CertiPUR	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ag-Standard 1000 mg L <sup>-1</sup>	CertiPUR	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ag-NP, Citrat-stabilisiert (10 nm)	-	Sigma Aldrich (München, Deutschland)
Ag-NP, Citrat-stabilisiert (20 nm, 30 nm, 40 nm, 60 nm und 80 nm)	-	Nanocomposix Europe (Prag, Tschechien)
Ag-NP, Citrat-stabilisiert (40 nm)	-	BBI Solutions (Cardiff, UK)
Ammoniumacetat	p. A.	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ammoniumhydrogencarbonat	Biochemica	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Ammoniumthiosulfat	98%	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Ar Gas 5.0	99,999%	Linde Ag (Pullach, Deutschland)
BAM N-001 Ag-NP	-	BAM (Berlin, Deutschland)
FL-70	-	Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland)
Huminsäure Natriumsalz	Technisch	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
In-Standard 1000 mg L <sup>-1</sup>	CertiPUR	Merck (Darmstadt, Deutschland)
La-Standard 1000 mg L <sup>-1</sup>	CertiPUR	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Lu-Standard 1000 mg L <sup>-1</sup>	CertiPUR	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Methanol	Rotisol, HPLC Gradient Grade	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumazid	Ultra, $\geq 99,5\%$	Fluka (Buchs, Schweiz)
Natriumchlorid	p. A.	neoLab Migge (Heidelberg, Deutschland)
Natriumdodecylsulfat	Biochemica	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Natriumhydroxid Plättchen	p. A.	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumnitrat	p. A.	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumthiosulfat Pentahydrat	Suprapur, 99,999%	Merck (Darmstadt, Deutschland)
NIST RM8011, RM8012, RM8013 Au-NP	-	NIST (Gaithersburg, MD, USA)
NIST SRM612	-	NIST (Gaithersburg, MD, USA)
DL-Penicillamin	99+%, Gold Grade	Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland)
Polystyrol NP (20 $\pm$ 2 nm, 46 $\pm$ 2 nm und 102 $\pm$ 2 nm)	-	Postnova Analytics (Landsberg am Lech, Deutschland)
Salpetersäure, 65%	p. A.	Merck (Darmstadt, Deutschland)

---

Stickstoffgas 5.0 Tune B	99,999%	Linde Ag (Pullach, Deutschland) Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
-----------------------------	---------	---

---

Reinstwasser ( $18,2 \Omega \text{ cm}^{-1}$ ) wurde in einem Millipore Element System (EMD Millipore, Billerica, MA, USA), ausgestattet mit einem Quantum ICP Filterelement, produziert. Die Salpetersäure und Salzsäure wurden vor der Verwendung mit einer Oberflächenverdampfungsanlage destilliert.

## 4.2 Nanopartikel

Die analysierten, Citrat-stabilisierten Ag-NP mit nominellen Durchmessern von 10 nm, 20 nm, 30 nm, 40 nm, 60 nm und 80 nm waren in 2 mM Natriumcitrat suspendiert. Diese NP werden im Rahmen dieser Arbeit als S10, NC20, BBI40 etc. bezeichnet. Das S, NC bzw. BBI steht dabei für den Hersteller (Sigma Aldrich, Nanocomposix oder BBI Solutions) und die Zahl für den nominellen Durchmesser. Für die NC NP wurden vom Hersteller folgende TEM Werte angegeben  $20,0 \pm 2,9 \text{ nm}$ ,  $32,7 \pm 4,8 \text{ nm}$ ,  $40,6 \pm 3,0 \text{ nm}$ ,  $60,8 \pm 6,6 \text{ nm}$  und  $79,8 \pm 5,4 \text{ nm}$ . Für die S10 und BBI40 NP sind keine TEM Werte vom Hersteller bekannt.

Die verwendeten Polystyrol(PS)-NP besaßen eine Konzentration von je etwa 1% und sind auf das National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, MD, USA) zurückführbare, mittlere, geometrische Durchmesser von  $20 \pm 2 \text{ nm}$ ,  $46 \pm 2 \text{ nm}$  und  $102 \pm 3 \text{ nm}$ . Die Durchmesser wurden mit dem TEM bestimmt.

## 4.3 Materialien und Geräte

### 4.3.1 Feldflussfraktionierung

In dieser Arbeit wurde eine AF2000 asymmetrische Fluss-Feldflussfraktionierung von Postnova Analytics (Landsberg am Lech, Deutschland) mit einem 280 mm langem Kanal und einem  $350 \mu\text{m}$  Spacer verwendet. Die Anlage verfügte über zwei binäre PN1122 Pumpen, einen PN7505 Entgaser, einen PN5200 Autosampler und einen Gilson 221 XL Fraktionssammler (Gilson Inc, Middleton, WI, USA). Ein manueller ST mit einer Polyetheretherketon(PEEK)-Kapillare wurde zur Abtrennung des oberen Teils des Kanalfusses kurz vor dem Detektorausgang verwendet. Eine Polyethersulfon(PES)-Membran mit einer Porenausschlussgröße von 5 kDa sowie eine reg. Cellulose-Membran mit 10 kDa wurden verwendet. [10]

Für die AF4-Messungen wurde ein Detektorfluss (DF) mit  $1 \text{ mL min}^{-1}$  eingestellt, von dem ein Teil (zwischen  $0,6\text{-}0,8 \text{ mL min}^{-1}$ ) über den ST in den Abfall geleitet wurde.

Für die FIA und Injektionen nach dem AF4-Kanal wurde ein Rheodyne MXP9900-000 6-Wege-Ventil (IDEX Europe GmbH, Erlangen, Deutschland) verwendet. Der interne Standard

wurde mittels einer externen Pumpe (LabCraft, Saint-Andre-des-Eaux, Frankreich) hinzugegeben.

Zur Filtrierung der FFF-Eluenten wurde eine CVC 24 Vakuumpumpe (Vacuubrand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland) mit einer Waschflasche, einer Fritte, einem Filteraufsatz (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) und einem 0,1 µm Cellulosemischester-Filter (Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) eingesetzt. [10]

### 4.3.2 Hohlfaser-Fluss-Feldflussfraktionierung-ICP-MS

Für die HF5-Experimente wurden drei verschiedene Hohlfasern aus PES, eine mit einer Porenausschlussgröße von 5 kDa (Postnova Analytics, Landsberg am Lech, Deutschland) und zwei mit 10 kDa (Postnova Analytics, Landsberg am Lech, Deutschland und Wyatt Technologies, Dernbach, Deutschland) untersucht. Ein Injektionsvolumen (IV) von 10 µL und eine Übergangszeit (ÜZ) von 0,2 min wurden verwendet. Die Messungen wurden je dreimal wiederholt.

### 4.3.3 Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Eine Smartline HPLC (Knauer GmbH, Berlin, Deutschland) mit zwei quaternären Smartline 1050 Pumpen und einem manuellen Injektionsventil aus PEEK sowie zwei UPC-Säulen mit Partikelgrößen von 7 µm und Porenausschlussgrößen von 1000 Å und 4000 Å (EC 250/4.6 Nucleosil 1000-7 C18 und EC250/4.6 Nucleosil 4000-7 C18, beide Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) wurden zur Partikeltrennung eingesetzt. Die Zugabe des isotopenangereicherten Standards zur Quantifizierung mittels IVA erfolgte über eine externe Pumpe (LabCraft, Saint-Andre-des-Eaux, Frankreich). [143]

### 4.3.4 UV/Vis-Detektion

Mittels eines SPD-20M Diodenzeilendetektors (engl. *diode array detector*, DAD) (Shimadzu, Berlin, Deutschland) wurden parallel zwei UV/Vis-Wellenlängen, 254 nm für organische Substanzen und 430 nm für Ag-NP, aufgezeichnet. Dabei wurden eine Bandbreite von 8 nm und eine Aufnahmezeit von je 160 ms verwendet.

### 4.3.5 ICP-MS

Als ICP-Q-MS-Geräte wurden die XSerie II und das iCAP Q (beide Thermo Fisher Scientific, Bremen, Deutschland) verwendet. Ersteres wurde für die Experimente in Kombination mit der Laserablation sowie zur Gesamtsilberbestimmung der Probe BAM N-001 verwendet. Für die FFF- und HPLC-Kopplungen sowie für die Experimente im EP-Modus und alle weiteren Analysen wurde das iCAP Q verwendet. Dieses wurde zur Durchführung von *off-line* Analysen oft in mit einem Cetac ASX-500 Autosampler (CETAC, Omaha, NE, USA) kombiniert.

Tabelle 2: Verwendete ICP-MS-Geräteparameter.

Parameter	iCAP Q	XSerie II
Zerstäuber	Konzentrischer PFA-Zerstäuber mit einer Aufnahme­rate von 400 $\mu\text{L min}^{-1}$	Konzentrischer Quarz-Zerstäuber mit einer Aufnahme­rate von 1 $\text{mL min}^{-1}$
Sprühkammer	Zyklonische Quarz-Sprühkammer	Konische Quarz-Sprühkammer
Fackel	Quarz, Injektorrohr mit 2,5 mm innerem Durchmesser	Quarz, mit Abschirmung aus Ag, Injektorrohr mit 2 mm innerem Durchmesser
Probenkonus	Ni	Ni
Skimmer Konus	Ni	Ni
Inlet	3,5 mm und 2,8 mm (EP-Modus) Einsatz	-
Leistung / W	1550	1400
Zerstäubergas Flussrate / $\text{L min}^{-1}$	1,04-1,09	0,98; 0,48 (LA-ICP-MS)
Zusatzgas Flussrate / $\text{L min}^{-1}$	0,65-0,80	0,7
Kühlgas Flussrate / $\text{L min}^{-1}$	14	13
Probeneintragsrate / $\text{mL min}^{-1}$	0,33	Selbstansaugend
Temperatur Sprühkammer / $^{\circ}\text{C}$	2,7	-
Integrationszeit / ms	0,1-10 (EP-ICP-MS); 10 ( <i>off-line</i> ICP-MS); 50 (HPLC-ICP-MS); 200 (AF4-ICP-MS)	50 (LA-ICP-MS); 100 ( <i>off-line</i> ICP-MS)

#### 4.3.6 Laserablation-ICP-MS

Für die LA-ICP-MS-Messungen wurde ein LSX-213 Nd:YAG-Laser (Cetac, Omaha, NE, USA) an die XSerie II gekoppelt. Als Ablationszelle wurde ein Prototyp aus dem Arbeitskreis von Prof. Detlef Günther (ETH Zürich, Schweiz) mit einem zweiten Gaseinlass gegenüber von dem ersten Gaseinlass verwendet. Eine genauere Beschreibung haben Moreno-Gordaliza *et al.* veröffentlicht. [144]

Zur Kalibrierung des LA-ICP-MS-Systems wurde das Standardreferenzmaterial NIST SRM612 eingesetzt. Hierfür wurden Reihenscans mit einer Laserpunktgröße von 200  $\mu\text{m}$ , einer Scanrate von 10  $\mu\text{m s}^{-1}$ , einer Pulsfrequenz von 20 Hz und 100% Laserenergie auf einem Glasstandard durchgeführt. Die Proben wurden mit einer Scanrate von 100  $\mu\text{m s}^{-1}$  und einer Pulsfrequenz von 20 Hz analysiert. Dabei betrugen die Laserenergie 1,2-2 mJ, der Laserdurchmesser im Fokus 200  $\mu\text{m}$  und die Strahlungsdichte 7,6-12,7  $\text{GW cm}^{-2}$ .

Zur Lokalisierung eines Ag-Rückstandes auf einer AF4-Membran wurde diese mit einem Linienabstand von 1-3 mm ablatiert. Für die Quantifizierung wurden Membranteile komplett mit einem Linienabstand von 175  $\mu\text{m}$  ablatiert. Aufgrund der Größe der zu analysierenden Membranflächen mussten diese in mehreren aufeinanderfolgenden Experimenten analysiert

werden. Als Trägergas des entstandenen Aerosols zum ICP-MS wurde He mit  $0,9 \text{ L min}^{-1}$  verwendet. Bevor das Aerosol das ICP-MS erreichte, wurde über eine Verzweigung im Aerosolschlauch Ar-Gas hinzugegeben. [10]

### 4.3.7 Weitere Materialien und Messgeräte

Für die DLS und Zetapotential-Analysen wurde ein Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK) im Rückstreuungsmodus mit einem Detektorwinkel von  $173^\circ$  verwendet. Ein Brechungsindex von 0,156 für die Ag-NP und eine Viskosität für Wasser von 0,8872 cP wurden für die Analyse verwendet. Für die Zetapotential-Experimente wurde, unter Einsatz des Smoluchowski-Modells, eine Dielektrizitätskonstante von 78,5 verwendet.

UV/Vis-Spektren über den gesamten Wellenlängen Bereich von 190-720 nm wurden mit einem AvaSpec-128 Spektrometer (Avantes, Apeldoorn, Niederlande) durchgeführt. Fluoreszenz-Messungen wurden *off-line* mittels Horiba Fluoromax 4 und *on-line* mittels Waters 470 Fluoreszenz-Detektor durchgeführt.

Zur Bestimmung der Form und Größe der NP wurde ein Zeiss Supra 40 (Zeiss, Oberkochen) Sekundärelektronenmikroskop (SEM) im Transmissions-Modus (TSEM) eingesetzt.

Zur Probenvorbereitung wurden eine MC1 Research RC 210 D Präzisionswaage (Sartorius, Göttingen, Deutschland), ein Kreisschüttler Sea Star (Heathrow Scientific, Vernon Hills, IL, USA), ein Sonorex RK 100 H Ultraschallbad (Bandelin, Berlin, Deutschland) und eine Heraeus Biofuge primo R Zentrifuge (Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Deutschland) verwendet.

Die pH-Wert-Messungen wurden mit einem Mettler Toledo Seven Easy pH-Meter (Mettler Toledo GmbH, Gießen, Deutschland) in Kombination mit einer Iod/Iodid IoLine pH-Einstabmesskette (SiAnalytics GmbH, Mainz, Deutschland) oder pH-Indikatorpapier (Lyphan, Neuhaus am Rennweg, Deutschland) durchgeführt. [10, 134, 143]

## 4.4 Probenvorbereitung

Um eine mögliche Aggregation zu vermeiden, wurden die Proben im Dunkeln und bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert. Die NP-Proben wurden vor der Verdünnung und Analyse für 5 min an die Raumtemperatur angeglichen und kräftig geschüttelt. [10]

### 4.4.1 Blindwertstudie

Die Blindwerte der eingesetzten Gefäße, welche Kontakt mit Säure hatten, wurden untersucht. Hierfür wurden 2 mL, 15 mL und 50 mL Behälter in Dreifachansätzen wie folgt behandelt:

- 1) Mit Reinstwasser befüllt,
- 2) Mit 2%  $\text{HNO}_3$  befüllt,
- 3) Dreifach mit Reinstwasser vorgespült und mit Reinstwasser befüllt und

- 4) Dreifach mit Reinstwasser vorgespült und mit 2% HNO<sub>3</sub> befüllt.

Die Gefäße wurden für 140 Stunden, was einem Vielfachen der tatsächlichen Säureexposition entspricht, auf dem Kreisschüttler mit einer Frequenz von 70 rpm ausgelaut. Die Ag-Konzentration wurde mittels externer Kalibrierung aus einer wässrigen Ag-Standardlösung für das Isotop <sup>107</sup>Ag bestimmt.

#### 4.4.2 Bestimmung des Gesamt-Ag-Gehaltes

Die Bestimmung des Gesamt-Ag-Gehaltes der NP erfolgte nach einer leicht veränderten Methode von Fabricius *et al.* [145] Hierbei wurden die NP in halbkonzentrierter Salpetersäure aufgeschlossen. Dafür wurden zu 100 µL der NP-Suspension 400 µL Reinstwasser, 1,4 mL HNO<sub>3</sub> sowie 100 µL einer Indium-Standardlösung als interner Standard gegeben. Für das XSeries II ICP-MS wurden 100 µL einer 100 mg L<sup>-1</sup> und für das iCAP Q ICP-MS 100 µL einer 10 mg L<sup>-1</sup> In-Standardlösung verwendet. Das Gemisch wurde für 90 min stehen gelassen bevor auf ein Volumen von 10 mL mit Reinstwasser aufgefüllt wurde. Die Proben wurden 1:200 (Citrat-stabilisierte Ag-NP) bzw. 1:100 (BAM N-001) in 3,25%-iger HNO<sub>3</sub> verdünnt und mittels ICP-MS analysiert. [145] Die Kalibrierstandards und Blindwerte wurden analog angesetzt. Für die Blindwerte und Kalibrierpunkte wurden Dreifachansätze und für die Proben zwölffache (BAM N-001) bzw. fünffache (Citrat-stabilisierte Ag-NP) Ansätze analysiert. [10, 145]

#### 4.4.3 Bestimmung des Gehaltes an Ag<sup>+</sup>-Ionen mittels Ultrafiltration

Der Gehalt an Ag<sup>+</sup>-Ionen wurde mittels Ultrafiltration basierend auf Fabricius *et al.* [145] ermittelt. Hierfür wurden drei PES-Ultrafiltrationseinheiten (Roti Spin Midi-10, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) mit Porenausschlussgrößen von je 10 kDa dreifach mit Wasser gespült und zum Konditionieren zweifach mit je 3,5 mL Reinstwasser befüllt und bei 2676 g 60 min lang zentrifugiert. Je 100 µL der NP-Suspension wurden auf die Membran gegeben und bei 2676 g für 15 min zentrifugiert. Anschließend wurde die Membran zum Spülen dreifach mit 300 µL Reinstwasser bei 2676 g für 15 min zentrifugiert. Ein Aliquot von 150 µL des Filtrates wurde mit Lanthan als interner Standard versetzt und 1:100 mit 2%-iger Salpetersäure bis zu einer La-Konzentration von 10 µg L<sup>-1</sup> verdünnt. Die Konzentration wurde mittels ICP-MS bestimmt. Hierfür wurde eine externe Kalibrierung mit einer wässrigen Ag-Standardlösung durchgeführt. [10, 145]

#### 4.4.4 Optimierung der ICP-MS

Vor der Analyse mittels ICP-MS wurden die in Tabelle 2 (Kapitel 4.3.5) genannten Parameter täglich optimiert. Dafür wurde eine 1 µg L<sup>-1</sup> bzw. 0,1 µg L<sup>-1</sup> (EP-ICP-MS) Tune B-Lösung (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) mit den Elementen Ba, Bi, Ce, Co, In, Li und U verwendet. Das Ziel war die Detektion möglichst hoher Signalintensitäten, besonders im

mittleren Massenbereich, bei einer Oxidrate zwischen 2-3%. Zur Überprüfung und Korrektur eines möglichen Gerätedriftes wurde für alle Analysen bis auf die EP-ICP-MS-Analysen ein interner Standard verwendet. Für die EP-ICP-MS-Analysen erfolgte die Driftkontrolle und -korrektur durch das wiederholte Messen von Kalibrierstandards über den Messtag.

### 4.4.5 *Off-line* AF4-ICP-MS-Experimente mit Fraktionssammlung

Neue AF4-Membranen wurden über Nacht mit 20% MeOH ausgelaugt und gründlich mit dem Eluenten gespült, bevor die erste Messung durchgeführt wurde. Es wurde täglich eine Blindwert-Messung, gefolgt von einer Analyse von bekannten Standards durchgeführt, bevor die Proben analysiert wurden.

Die Fraktionen für die ICP-MS-Analyse wurden in Intervallen von 90 s gesammelt, mit 5%-iger Salpetersäure versetzt und mit Reinstwasser verdünnt. Eine wässrige La-Standardlösung mit einer Konzentration von  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  wurde als interner Standard verwendet. Weiterhin wurde die Verwendung einer wässrigen In-Standardlösung ( $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ) direkt in dem AF4-Eluenten untersucht. Zur Kalibrierung mittels ICP-MS wurde eine wässrige Ag-Standardlösung eingesetzt. [10]

### 4.4.6 *On-line* AF4-ICP-MS

Während der *on-line* AF4-ICP-MS-Experimente wurde als interner Standard eine  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  wässrige In-Standardlösung in 5% Salpetersäure nach dem Kanal über eine externe Pumpe dem DF zugefügt. Während der Fokussierungszeit (FZ) wurde eine dreifache FIA-Kalibrierung mit einer wässrigen Ag-Standardlösung durchgeführt. Eine Konzentration von  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  Ag wurde hierbei verwendet. Die NWG wurde über das dreifache Signal-zu-Rausch-Verhältnis berechnet. [10]

Das Volumen der Schleife des 6-Wege-Ventils wurde mit wässrigen Ag-Standardlösungen bestimmt. Hierbei wurde die Schleife für 10 min mit den Standardlösungen mit Konzentrationen von  $0 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $250 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  und  $5000 \mu\text{g L}^{-1}$  Ag in 5%-iger  $\text{HNO}_3$  befüllt. Das Ventil wurde in den Elutionsmodus umgestellt. Durch die angeschlossene AF4 wurde der Ag-Standard mit einem Fluss von  $0,4 \text{ mL min}^{-1}$  für 1 min aus der Schlaufe gespült und in fünffachen Ansätzen mit einem Probengefäß aufgefangen. Die Probengefäße wurden vor und nach der Elution gewogen. Je  $350 \mu\text{L}$  der so aufgefangenen Lösung wurden mit  $500 \mu\text{L}$   $\text{HNO}_3$  und  $100 \mu\text{L}$  einer  $1 \text{ mg L}^{-1}$  In-Standardlösung versetzt und auf 10 mL mit Reinstwasser aufgefüllt. Aus der Steigung der Auftragung der eingesetzten gegen die detektierte Konzentration wurde das Schleifenvolumen bestimmt. [10]

Für die Größenkalibrierung mittels NIST Au-NP wurden die RM8011, 8012 und 8013 je 1:1000, 1:500 und 1:333 in Reinstwasser verdünnt, da dieses in etwa gleichen



Peakintensitäten resultierte. Dabei wurden eine FZ von 4 min, ein IV von 20  $\mu\text{L}$ , ein STF von 0,6  $\text{mL min}^{-1}$  und Reinstwasser als Eluent verwendet.

Wenn nicht anders in den Fraktogrammen vermerkt, wurden für die Methodenoptimierung der Citrat-stabilisierten Ag-NP eine 5 kDa PES-Membran, eine FZ von 5 min, eine ÜZ von 0,2 min und ein linearer QF-Gradient von 1-0,1  $\text{mL min}^{-1}$  in 40 min und 0,1-0  $\text{mL min}^{-1}$  in 10 min gefolgt von einem konstanten Fluss mit 0  $\text{mL min}^{-1}$  für 5 min sowie ein Spülfluss (SF) von 3  $\text{mL min}^{-1}$  für 5 min mit offenem Spülventil verwendet. Je 20  $\mu\text{L}$  eines Gemisches aus 10  $\mu\text{L}$  NC20, 20  $\mu\text{L}$  NC60 und 970  $\mu\text{L}$  Reinstwasser wurden als Probe injiziert.

#### 4.4.7 Probenverluste im AF4-System

Um einen möglichen Probenverlust in der AF4 zu lokalisieren, wurden Experimente sowohl ohne QF als auch komplett ohne Kanal durchgeführt. Für Letzteres wurde die Probe über ein manuelles Injektionsventil, welches direkt mit dem T-Stück zur Zugabe des internen Standards verbunden wurde, zugegeben. Für jede der beiden Untersuchungen wurden sechs Ansätze analysiert. [10]

#### 4.4.8 Hochdruckflüssigkeitschromatographie-ICP-MS

Als Eluent wurde eine Mischung aus 10 mM Natriumdodecylsulfat (engl. *sodium dedocyl sulfate*, SDS), 10 mM Ammoniumacetat mit einer Zugabe von Natriumthiosulfat (1 mM) oder Penicillamin mit einem pH von etwa 6,7 verwendet. Während der Eluentenoptimierung wurden verschiedene Penicillamin-Konzentrationen (100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , 250  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$  und 1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) untersucht. Der Eluent wurde vor der Verwendung über einen 0,2  $\mu\text{m}$  PES-Spritzenfilter (Rotilabo, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) filtriert und für 30 min im Ultraschallbad entgast. Die Proben wurden direkt vor der Analyse mit dem Eluenten verdünnt und im Ultraschallbad für ca. 2 min entgast. Ein Fluss von 0,5  $\text{mL min}^{-1}$  wurde für die Analysen verwendet. Mittels der 1000 Å-Säulen wurden je zwei unterschiedliche Konzentrationen der Ag-NP analysiert und die Messungen mindestens dreifach wiederholt. Die Detektion erfolgte mit einem ICP-MS bzw. einem UV/Vis-Detektor (PS-NP).

Zur Kalibrierung der HPLC-ICP-MS-Experimente wurde ein wässriger, isotonenangereicherter  $^{109}\text{Ag}$ -Standard mit einer Konzentration von 1,91  $\mu\text{g L}^{-1}$  über ein T-Stück nach der Säule mittels einer externen Pumpe mit einer Geschwindigkeit von 94  $\mu\text{L min}^{-1}$  dem DF zugeführt. Die Konzentration des isotonenangereicherten  $^{109}\text{Ag}$ -Standards wurde mittels einer umgekehrten IVA bestimmt. Hierfür wurden 1:1, 1:2 und 2:1 Mischungen einer Ag-Standardlösung mit dem isotonenangereicherten  $^{109}\text{Ag}$ -Standard angesetzt und analysiert. Zur Bestimmung der Massendiskriminierung wurden ein Ag-Standard und der isotonenangereicherte  $^{109}\text{Ag}$ -Standard mittels ICP-MS analysiert und die Molmasse sowie die Isotopenhäufigkeit berechnet. Die Massendiskriminierung wurde regelmäßig neu bestimmt.

Das Volumen der HPLC-Injektionsschleife wurde durch die Überbrückung der Säule und mittels IVA bestimmt. Dabei wurden Konzentrationen von  $0 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  und  $2 \mu\text{g L}^{-1}$  einer wässrigen Ag-Standardlösung in fünffach Ansätzen über die Schleife injiziert. Durch eine lineare Auftragung der injizierten Konzentration  $c_s$  gegen die erhaltenen, absoluten Massen  $m_s$  kann das Volumen der Schleife  $V_s$  erhalten werden.

$$m_s = c_s \cdot V_s + b_s \quad (41)$$

mit

$b_s$  = Blindwert

Die Systemwiederfindung wurde durch die Überbrückung der HPLC-Säule bestimmt. Hierbei wurde eine externe Kalibrierung ( $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  und  $2 \mu\text{g L}^{-1}$  Ag) verwendet und die Proben mit einer Konzentration von etwa  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  fünffach analysiert. Indium ( $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ) wurde als interner Standard zugegeben.

Die Säulenwiederfindung der  $\text{Ag}^+$ -Ionen wurde durch die Injektion von wässrigen Ag-Standardlösungen mit Konzentrationen von  $0 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  und  $2 \mu\text{g L}^{-1}$  Ag ( $N=5$ ) mit dem bekannten Schleifenvolumen berechnet. Die Säulenwiederfindung  $R_c$  ergibt sich aus einer Auftragung der injizierten Konzentration  $c_R$  gegen die ermittelte Ag-Masse  $m_R$ .

$$\frac{m_R}{V_s} = c_R \cdot R_c + b_R \quad (42)$$

mit

$b_R$  = Blindwert

Für die HPLC-ICP-MS-Messungen im EP-Modus wurde eine Probenkonzentration von etwa  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$  Ag und die  $1000 \text{ \AA}$ -Säule verwendet. Hierfür wurden sechs Experimente der NC40 NP durchgeführt und der Bereich mit Retentionszeiten zwischen 200-310 s mittels der in Kapitel 3.6.4 beschriebenen EP-ICP-MS-Gleichungen ausgewertet. [143]

Die NWG wurde mittels Gleichung 43 berechnet. [146]

$$\text{NWG} = \frac{3\sigma}{b} = \frac{3\sigma \cdot c(\text{Probe})}{h_p} \quad (43)$$

mit

$\sigma$  = Standardabweichung vom Untergrund (bei einer Retentionszeit von etwa 50-150 s),  $b$  = Steigung,  $h_p$  = Peakhöhe

#### 4.4.9 Laserablation-ICP-MS

Zur Quantifizierung wurde eine Matrix-angepasste Tropfenkalibrierung durchgeführt. Hierfür wurden Membranstücke über Nacht in 20% MeOH und anschließend für mehrere Stunden in den Eluenten eingelegt. Auf die Membran wurden fünffach sieben unterschiedliche Konzentrationen ( $0 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $0,03 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $0,16 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $0,31 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $1,56 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $15,63 \text{ mg L}^{-1}$  und  $46,89 \text{ mg L}^{-1}$ ) der BAM N-001 Ag-NP und ein Blindwert in  $0,5 \mu\text{L}$  Tropfen aufgegeben. Zur besseren Visualisierung wurde etwas rote Lebensmittelfarbe (Wusitta rot, Erich Wutzig, Sitzendorf, Deutschland) zu den unterschiedlichen Konzentrationen gegeben. Eine wässrige Lutetium-Standardlösung mit einer absoluten Menge von  $0,5 \text{ ng Lu}$  pro Tropfen wurde auf ihre Tauglichkeit als interner Standard für die Kalibrierung untersucht. Vor der Ablation wurden die Membranen getrocknet.

Als mögliche interne Standards für die AF4-Membranen wurden ebenfalls  $^{13}\text{C}$ , als Signal der unteren Celluloseschicht der Membran, und eine wässrige In-Standardlösung mit einer Konzentration von  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ , welche dem AF4-Eluenten zugesetzt wurde, überprüft.

Zur Lokalisierung des Ag-Rückstandes wurde eine AF4-Membran, auf welche in vier AF4-Experimenten eine gesamte, absolute Ag-Menge von  $25,0 \mu\text{g}$  gegeben wurde, vorsichtig aus dem Kanal entfernt und getrocknet. Es wurde mit Linienabständen von 1-3 mm ablatiert. Für die Quantifizierungsexperimente der Ag-Rückstände wurden eine Blindwert- und zwei Probenmembranen untersucht. Je 10 AF4-Läufe mit Injektionen von je  $10 \mu\text{L}$  Reinstwasser (Blindwertmembran), einer  $0,25 \text{ mg L}^{-1}$  (Probenmembran 1) und einer  $3,13 \text{ mg L}^{-1}$  BAM N-001 Suspension (Probenmembran 2) wurden durchgeführt und die Membranen anschließend getrocknet. Für die LA-ICP-MS-Messungen der AF4-Membranen wurden diese, wenn nötig, in kleinere Stücke geschnitten und auf Mikroskop-Objektträger (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) befestigt. Diese wurden in der Ablationszelle eingespannt und ablatiert. Zwischen den Ablationsexperimenten wurde die Zelle manuell mit Reinstwasser gereinigt. Die mittels LA-ICP-MS erhaltenen Linienscans wurden nach den Experimenten zu zweidimensionalen Kontourdiagrammen zusammengefügt. Der Kanalbereich sowie der Bereich außerhalb des Kanals wurden integriert. Eine Blindwert- und Untergrundkorrektur wurde für die quantitativen Experimente durchgeführt. Die Untergrundkorrektur erfolgte durch Abzug des Wertes für den Bereich außerhalb der Tropfen für die Kalibration bzw. außerhalb des Kanals für die Proben vom Wert für die Tropfen bzw. innerhalb des Kanals. Die mittlere Intensität pro Pixel wurde berechnet, und durch Abzug der mittleren Intensität pro Pixel des Blindwerttropfens bzw. der Blindwertmembran wurde eine Blindwertkorrektur durchgeführt. Für die Kalibriergerade wurde die mittlere Intensität pro Pixel der Tropfen gegen die absolute Konzentration aufgetragen. Die NWG der Kalibrierung wurden mit Gleichung 44 berechnet. [147]

$$\text{NWG} = B + 3 \cdot sB \quad (44)$$

mit

$B$  = Mittelwert des Untergrundes,  $sB$  = Standardabweichung des Untergrundes

Für die Proben wurden der erhaltene Wert in die Kalibriergerade eingesetzt und die Wiederfindungsrate der injizierten Konzentration auf der Membran berechnet. [10]

### 4.4.10 Einzelpartikel-ICP-MS

Für die EP-ICP-MS-Experimente wurden die NP-Suspensionen direkt vor der Analyse verdünnt. Oftmals waren zwei Verdünnungsschritte notwendig, wobei die Probe nach dem ersten Schritt zusätzlich für 5 min im Ultraschallbad behandelt wurde.

Als Suspensionsmittel wurden Reinstwasser, 2 mM Natriumcitrat und 2 mM Ammoniumcitrat untersucht. Eine externe Kalibrierung des jeweiligen Elementes mit Konzentrationen von  $0 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$  und  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  und einer Analysenzeit von 90 s wurde zur Größenbestimmung verwendet. Während der Optimierung wurden Integrationszeiten von 0,1 ms, 1 ms, 3 ms, 5 ms und 10 ms untersucht. Die Pumpengeschwindigkeit betrug  $0,33 \text{ mL min}^{-1}$  bei einer Analysenzeit von 10 min.

Zur Imitierung einer 1:20 verdünnten Meerwassermatrix wurde die finale Probenverdünnung in einer 30 mM Natriumchlorid-Lösung angesetzt.

Zur Durchführung der EP-ICP-MS in Kombination mit der IVA wurde ein wässriger, isotonenangereicherter  $^{109}\text{Ag}$ -Standard zur finalen Verdünnung der Proben gegeben. [134]

### 4.4.11 Dynamische Lichtstreuung und Zetapotential-Experimente

Vor der Analyse der Proben wurden die 1,5 mL Halbmikroküvetten aus Polymethylmethacrylat (PMMA) (Brandt GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland) unter einem Stickstoffgasstrom von möglichen Staubpartikeln befreit. Die Probe wurde vor dem Einfüllen durch einen  $0,2 \mu\text{m}$  PES-Spritzenfilter (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) gegeben, um größeren Verunreinigungen zu entfernen.

Die Messung des Zetapotentials wurde in einer DTS1060 gefalteten Kapillarzelle aus Polycarbonat (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK) durchgeführt. Diese wurde nach der Analyse gründlich mit Reinstwasser gespült und anschließend wiederverwendet.

Für das Zetapotential und den hydrodynamischen Durchmesser wurden je drei Experimente bei einer Temperatur von  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. [10]

### 4.4.12 UV/Vis-Spektrometer

Für die Aufnahme von UV/Vis-Spektren wurde zunächst der Dunkelstrom mit einer geschlossenen Blende gemessen. Anschließend wurde das Suspensionsmittel als Referenz

analysiert. Schließlich wurde das Spektrum der Probe aufgezeichnet und von dieser automatisch sowohl eine Blindwertkorrektur wie auch eine Suspensionsmittelkorrektur durchgeführt. Für die Messungen wurden 1,5 mL Halbmikroküvetten aus PMMA (Brandt GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland) verwendet. Die Proben wurden 1:10 mit dem Eluenten verdünnt.

#### 4.4.13 **Sekundärelektronenmikroskopie im Transmissions-Modus**

Vor der Analyse wurden die Proben für 5 min im Ultraschallbad behandelt. Ein Aliquot von 0,5 µL der Probe wurde auf ein mit Kohlenstoff überzogenes Kupfer-Netz (Plano, Wetzlar, Deutschland) gegeben und luftgetrocknet. [10]

#### 4.4.14 **Huminsäure-Suspension**

Eine 10 mg L<sup>-1</sup> Stammlösung des Huminsäure Natriumsalzes wurde über 0,45 µm reg. Cellulose-Spritzenfilter (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) filtriert und mit einer aus NaOH Plättchen hergestellten 1 mM NaOH Lösung auf pH 7,4 eingestellt. Diese sowie die Proben der Zeitreihe, wurden bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Bestimmung des Blindwertes

Um Interferenzen durch Verunreinigung mit anderen Elementen in der ICP-MS zu minimieren, wurden die Blindwerte der verwendeten AF4-, HPLC- und EP-ICP-MS-Gefäße täglich vor der Analyse der Proben untersucht. Hierbei konnten keine Spuren von Ag gefunden werden. Für die Gefäße, welche für die *off-line* ICP-MS-Experimente verwendet wurden und Kontakt mit verdünnter  $\text{HNO}_3$  hatten, wurden die Blindwerte untersucht. Die gefundenen Ag-Gehalte sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Blindwertuntersuchung für Gefäße mit einem Volumen von 2 mL, 15 mL und 50 mL.

Reinigung	2 mL Gefäß / $\text{ng L}^{-1}$	15 mL Gefäß / $\text{ng L}^{-1}$	50 mL Gefäß / $\text{ng L}^{-1}$
Reinstwasser	*	*	*
Spülen und Reinstwasser	*	*	*
2% $\text{HNO}_3$	*	$0,7 \pm 0,4$	$7 \pm 10$
Spülen und 2% $\text{HNO}_3$	*	*	$0,6 \pm 0,4$

\* Konzentration lag unterhalb der Nachweisgrenze von  $0,37 \text{ ng L}^{-1} \text{ Ag}$

Wie aus den Daten in Tabelle 3 erkennbar ist, liegen die Blindwerte in Reinstwasser mit oder ohne Vorspülen unterhalb der Nachweisgrenze. Für die 2 mL Gefäße konnte auch nach dem Auslaugen mit 2%  $\text{HNO}_3$  keine nachweisbare Konzentration detektiert werden. Ein Vorspülen der 15 mL und 50 mL Gefäße führte zu einer deutlichen Reduktion der Blindwerte in 2%  $\text{HNO}_3$  bis in den nicht mehr nachweisbaren Bereich (15 mL). Für die größten Behälter wurde nach der Vorreinigung und dem Befüllen mit 2%  $\text{HNO}_3$  eine Ag-Konzentration von  $0,6 \pm 0,4 \text{ ng L}^{-1}$  detektiert. Die detektierten Werte werden vermutlich durch eine polyatomare  $^{40}\text{Ar}+^{67}\text{Zn}$  (mit einer Häufigkeit von 4,1%) verursacht. Für diese Gefäße könnten geringe Zn-Intensitäten während der Analyse nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher für diese Gefäße eine Blindwertkorrektur durchgeführt. Weiterhin wurden die Gefäße, die verdünnter Säure ausgesetzt waren, mit Reinstwasser vorgespült.

### 5.2 Bestimmung des Gesamtsilbergehaltes

Der Gesamtgehalt der Ag-NP wurde mittels saurem Aufschluss bestimmt. Die so erhaltenen Ag-Konzentrationen, welche als Referenzwert für die Bestimmung der Wiederfindungsraten im Rahmen dieser Arbeit gelten, sind in Tabelle 4 zusammengefasst. [10, 143]

Tabelle 4: Mittels saurem Ausschluss detektierte Ag-Konzentrationen der untersuchten NP-Proben.

<b>Probe</b>	<b>Ag-Konzentration / mg L<sup>-1</sup></b>
BAM N-001	62,5 ± 1,3
S10	22,45 ± 0,26
NC20	20,2 ± 0,4
NC30	22,6 ± 0,3
NC40	20,8 ± 0,5
NC60	29,3 ± 0,5
NC80	29,6 ± 0,4

### 5.3 DLS und Zetapotential

Um die Stabilität der NP im Eluenten zu ermitteln, wurde vor der FFF-Analyse das Zetapotential bestimmt. Bei unzureichender Stabilität der NP-Suspension wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Aggregation beobachtet. Zusätzlich wurde mittels DSL der hydrodynamische Durchmesser ermittelt. Für die DLS- und Zetapotential-Messungen wurden die Proben, um FFF-ähnliche Bedingungen zu simulieren, 1:10 verdünnt. Der Effekt von unterschiedlichen Suspensionsmitteln auf die NP wurde untersucht. Tabelle 5 gibt die erhaltenen Zetapotentiale, die Leitfähigkeit und den pH-Wert für die untersuchten Ag-NP-Proben in unterschiedlichen Suspensionsmitteln wieder.

Aus Tabelle 5 ist eine stark vom Suspensionsmittel abhängige Stabilität für die NP zu erkennen. Vereinfacht wird ein Zetapotential von -30 mV oder negativer als stabil betrachtet. [57] Die BAM N-001 sind bei pH 6,6 in SDS am stabilsten und neigen in Reinstwasser mit pH 7 leicht zur Bildung von Agglomeraten. Für die Citrat-stabilisierten NP nimmt das Zetapotential, wie beschrieben [148], mit steigender Größe in Reinstwasser und Natriumcitratlösung ab. In der HS-Lösung ist das Zetapotential nahezu unabhängig von der Partikelgröße, somit haben alle in Tabelle 5 gelisteten NP eine ähnliche, hohe Stabilität.

In Tabelle 6 sind die mittels DLS erhaltenen, hydrodynamischen Durchmesser und die Peakbreite, welche als Maß für die Größenverteilung polydisperser Partikelsysteme dient, aufgelistet. Daraus ist ein Zusammenhang der nominellen Partikelgröße mit der mittels DLS bestimmten Größe zu erkennen. Die BAM NP zeigen eine breite Verteilung mit einer Peakbreite zwischen 27-33 nm und ähnliche Durchmesser in den untersuchten Eluenten. In Reinstwasser zeigten die Citrat-stabilisierten NP einen etwas größeren Durchmesser als in Natriumcitrat. Ein Vergleich der Durchmesser in Natriumcitratlösung und Reinstwasser mit der HS-Lösung zeigt deutlich höhere hydrodynamische Durchmesser in der HS-Lösung, welches auf Aggregate/Agglomerate hindeutet. Der Blindwert der HS-Suspension zeigt, dass bereits Agglomerate/Aggregate mit einem Durchmesser von 183,5 nm und einer Peakbreite von

74 nm vorhanden sind. Durch die Ag-NP-Zugabe kann das Peakmaximum zu kleineren Durchmessern verschoben werden. Für die S10 NP wurden hierbei zwei Peaks detektiert, was auf einen S10- und einen HS-Peak hindeutet. [10, 143]

Tabelle 5: Zetapotential, Leitfähigkeit und pH-Wert der untersuchten Ag-NP Proben unter Verwendung unterschiedlicher Suspensionsmittel.

Probe	Suspensionsmittel	Zetapotential / mV	Leitfähigkeit / mS cm <sup>-1</sup>	pH- Wert
BAM N-001	200 mg L <sup>-1</sup> NaN <sub>3</sub>	-28,3 ± 2,7	0,319 ± 0,006	7 <sup>#</sup>
BAM N-001	1 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> , pH 7,4	-21,0 ± 1,0	0,392 ± 0,007	7,4
BAM N-001	0,01% SDS, 200 mg L <sup>-1</sup> NaN <sub>3</sub>	-42,9 ± 2,9	0,309 ± 0,004	6,6
BAM N-001	0,005% FL-70, 200 mg L <sup>-1</sup> NaN <sub>3</sub>	-27,9 ± 2,4	0,316 ± 0,005	7,2
S10	2 mM Natriumcitrat	-17,1 ± 1,3	0,59 ± 0,03	6,5
NC20	2 mM Natriumcitrat	-17,7 ± 1,7	0,34 ± 0,01	6,5
NC30	2 mM Natriumcitrat	-25,0 ± 0,6	0,39 ± 0,02	6,5
NC40	2 mM Natriumcitrat	-33,5 ± 2,4	0,364 ± 0,007	6,5
NC60	2 mM Natriumcitrat	-39,6 ± 1,8	0,345 ± 0,009	6,5
NC80	2 mM Natriumcitrat	-39,9 ± 0,9	0,344 ± 0,006	6,5
NIST10	2 mM Natriumcitrat	-69,5 ± 2,7	0,686 ± 0,022	6,5
NIST30	2 mM Natriumcitrat	-36,5 ± 0,8	0,230 ± 0,005	6,5
NIST60	2 mM Natriumcitrat	-37,3 ± 0,8	0,306 ± 0,004	6,5
S10	Reinstwasser	-18 ± 4	0,071 ± 0,001	6,8
BAM N-001	Reinstwasser	-18,0 ± 1,3	0,023 ± 0,003	7 <sup>#</sup>
NC20	Reinstwasser	-20,2 ± 1,2	0,077 ± 0,001	6,8
NC30	Reinstwasser	-30,3 ± 0,2	0,078 ± 0,001	6,8
NC40	Reinstwasser	-40,1 ± 1,2	0,056 ± 0,001	6,8
NC60	Reinstwasser	-39,2 ± 0,9	0,078 ± 0,001	6,8
NC80	Reinstwasser	-42,0 ± 1,7	0,080 ± 0,001	6,8
PS20	Reinstwasser	-51,0 ± 1,3	0,864 ± 0,025	7 <sup>#</sup>
PS50	Reinstwasser	-46,7 ± 0,9	0,075 ± 0,001	7 <sup>#</sup>
Blindwert	10 mg L <sup>-1</sup> HS	-64,0 ± 2,1	0,171 ± 0,001	7,5
S10	10 mg L <sup>-1</sup> HS	-67,6 ± 4,6	0,090 ± 0,001	7,5
NC20	10 mg L <sup>-1</sup> HS	-75,3 ± 1,6	0,088 ± 0,001	7,5
NC30	10 mg L <sup>-1</sup> HS	-69 ± 9	0,073 ± 0,001	7,5
NC40	10 mg L <sup>-1</sup> HS	-68 ± 6	0,065 ± 0,001	7,5
NC60	10 mg L <sup>-1</sup> HS	-63 ± 12	0,077 ± 0,001	7,5

<sup>#</sup>gemessen mit pH-Papier.



Tabelle 6: Mittels DLS bestimmte hydrodynamische Partikeldurchmesser der Ag-NP unter Verwendung unterschiedlicher Suspensionsmittel.

Probe	Eluent	Hydrodynamischer Durchmesser (Intensitäts-gewichtet) / nm	Peakbreite (Intensitäts-gewichtet) / nm
BAM N-001	200 mg L <sup>-1</sup> NaN <sub>3</sub>	49,5 ± 2,0	27 ± 6
BAM N-001	1 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> , pH 7,4	51,2 ± 2,9	33 ± 6
BAM N-001	0,01% SDS, 200 mg L <sup>-1</sup> NaN <sub>3</sub>	47,2 ± 2,2	24 ± 8
BAM N-001	0,005% FL-70, 200 mg L <sup>-1</sup> NaN <sub>3</sub>	51,0 ± 0,5	30 ± 9
S10	2 mM Natriumcitrat	18,2 ± 2,1	6,9 ± 2,1
NC20	2 mM Natriumcitrat	33,9 ± 0,9	12,0 ± 2,1
NC30	2 mM Natriumcitrat	44,2 ± 0,3	15,5 ± 1,3
NC40	2 mM Natriumcitrat	55,5 ± 1,2	21,1 ± 2,5
NC60	2 mM Natriumcitrat	74,1 ± 1,4	28,0 ± 2,9
NC80	2 mM Natriumcitrat	100,3 ± 0,8	38,4 ± 1,1
NIST10	2 mM Natriumcitrat	15,1 ± 1,5	6,1 ± 0,7
NIST30	2 mM Natriumcitrat	40,1 ± 0,6	17,5 ± 2,3
NIST60	2 mM Natriumcitrat	72,8 ± 1,0	32,9 ± 1,7
S10	Reinstwasser	27 ± 4	15 ± 4
BAM N-001	Reinstwasser	51,1 ± 2,3 <sup>#</sup> ; 34,7 ± 0,9 <sup>+</sup>	27 ± 9 <sup>#</sup> ; 26,4 ± 0,9 <sup>+</sup>
NC20	Reinstwasser	47,9 ± 2,7	22 ± 4
NC30	Reinstwasser	51,2 ± 1,8	18,2 ± 2,1
NC40	Reinstwasser	65 ± 4	26 ± 5
NC60	Reinstwasser	83,3 ± 0,7	35,3 ± 1,6
NC80	Reinstwasser	106,8 ± 0,9	40,3 ± 1,9
PS20	Reinstwasser	23,4 ± 0,3	6,93 ± 0,62
PS50	Reinstwasser	54,1 ± 1,0	10,6 ± 1,8
Blindwert	10 mg L <sup>-1</sup> HS	184 ± 11	74 ± 11
S10	10 mg L <sup>-1</sup> HS	192 ± 45; 25 ± 8	72 ± 38; 11 ± 8
NC20	10 mg L <sup>-1</sup> HS	71,5 ± 1,7	44 ± 4
NC30	10 mg L <sup>-1</sup> HS	51,7 ± 0,7	20,2 ± 1,6
NC40	10 mg L <sup>-1</sup> HS	63,1 ± 1,0	22,9 ± 1,8
NC60	10 mg L <sup>-1</sup> HS	83,0 ± 1,2	41,1 ± 2,0

<sup>#</sup>Probenvorbereitung für die AF4, <sup>+</sup>Probenvorbereitung entsprechend den anderen Proben.

## 5.4 Charakterisierung mit der AF4-ICP-MS-Kopplung

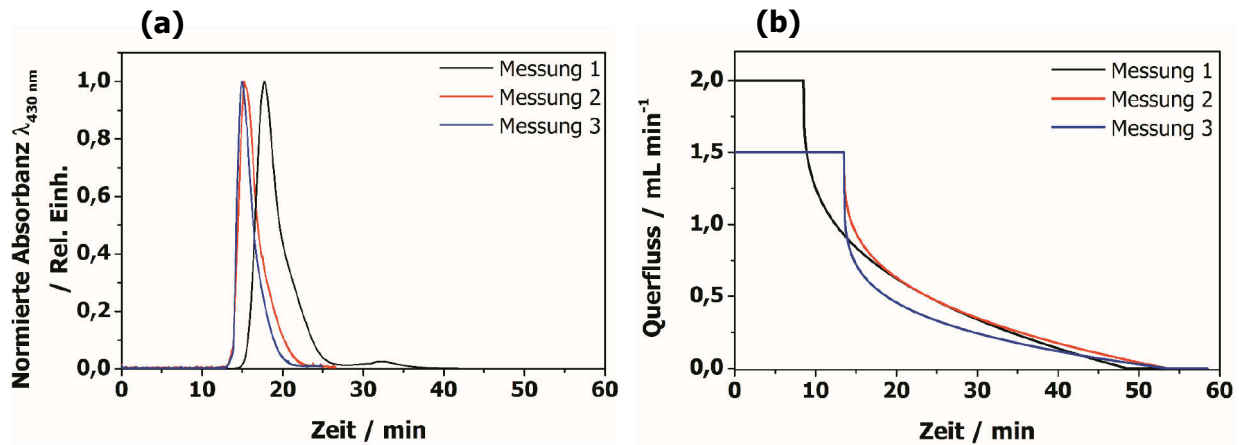
Das Ziel der AF4-Trennung der BAM N-001 Ag-NP war neben einer vollständigen Elution bei möglichst hoher Auflösung auch das Erzielen hoher Wiederfindungsraten und die Vermeidung der Bildung von Aggregaten. Dafür wurden verschiedene Detektoren und Membrantypen untersucht sowie der QF-Gradient, die FZ, das IV bzw. die Injektionsmenge, die Spacerhöhe und der Eluent optimiert. Da hohe Wiederfindungsraten und niedrige Verluste eine große Herausforderung in der AF4 darstellen, sollten mögliche Verluste auf der Membran mittels LA-ICP-MS und im AF4-System systematisch untersucht werden.

### 5.4.1 *Off-line* Charakterisierung von BAM N-001 mit der AF4-UV/Vis-ICP-MS-Kopplung

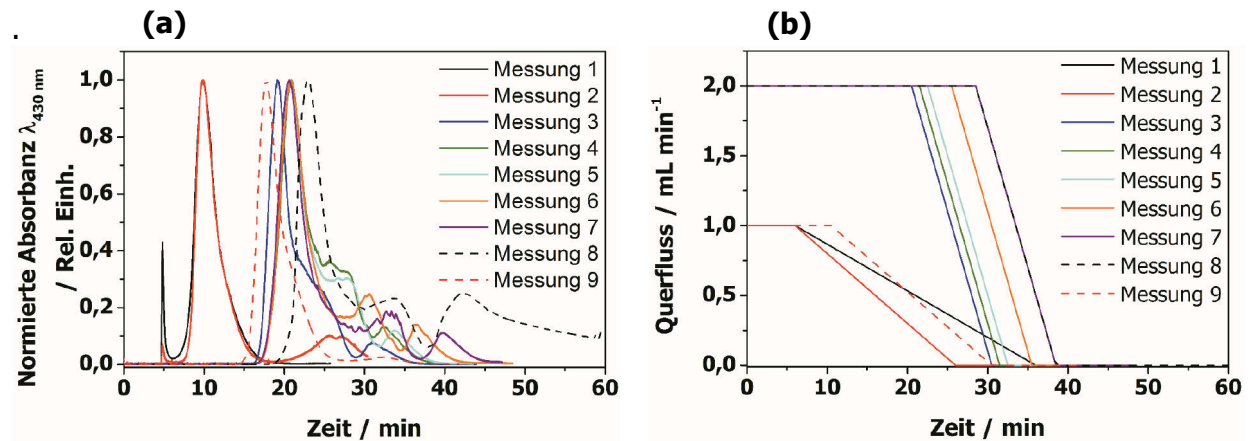
Zunächst wurde eine Methodenoptimierung für die BAM N-001 durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein mittels SAXS Größen-zertifiziertes Referenzmaterial, mit welchem die AF4 auf ihre Tauglichkeit zur Ag-NP-Analyse überprüft werden sollte. Im weiteren Verlauf sollte dieses Material als Vergleichsstandard für Citrat-stabilisierte Ag-NP dienen.

Zur Detektion in Kombination mit der AF4 standen eine Vielzahl möglicher Detektoren (UV/Vis-, Brechungsindex-, Mehrwinkel-Lichtstreuung-, DLS-, Viskometrie-Detektor und ICP-MS) zur Verfügung. Aufgrund der Plasmonenresonanz war es nicht möglich, mittels Mehrwinkel-Lichtstreuung zuverlässige Ergebnisse für Ag-NP zu erhalten. Das Viskosimeter konnte aufgrund der geringen Viskosität der Analyten ebenfalls nicht verwendet werden. In Vorversuchen zeigte sich das DLS-Instrument als zu unempfindlich. Somit wurden zunächst der UV/Vis- und Brechungsindex-Detektor ausgewählt.

Im ersten Schritt wurde der QF-Gradient im Hinblick auf eine möglichst hohe Auflösung variiert. In den Abbildungen 18 a und b sind die Fraktogramme unter Verwendung der gewählten, exponentiellen QF-Profilen dargestellt. Die Peaks in Abbildung 18a weisen eine deutliche Asymmetrie zu höheren Retentionszeiten auf, was auf Aggregate oder eine polydisperse Größenverteilung der Probe hindeuten könnte. Die höchste Auflösung wurde hierbei für einen QF von  $2 \text{ mL min}^{-1}$  (Messung 1) erhalten. Um eine bessere Auflösung zu erzielen, wurde die Trennung zusätzlich unter Verwendung eines linearen QF-Gradienten untersucht. Dabei wurden weitere Parameter wie das IV, die FZ, die ÜZ, der DF und der STF variiert. In Abbildungen 19 a und b sind die Fraktogramme (UV/Vis-Detektor,  $\lambda_{430 \text{ nm}}$ ) sowie QF-Gradienten dargestellt. Tabelle 7 fasst die optimierten Methodenparameter zusammen.



Abbildungen 18 a und b: Fraktogramme (a) und dafür verwendete exponentielle QF-Profile (b) dreier Messungen der Probe BAM N-001 (200 mg L<sup>-1</sup> NaN<sub>3</sub> als Eluent, 350  $\mu$ m Spacer, 5 kDa PES-Membran, FZ 8 min, ÜZ 0,5 min, DF 1,5 mL min<sup>-1</sup> und SF 1,28 mL min<sup>-1</sup>, UV/Vis-Detektor  $\lambda_{430 \text{ nm}}$ ).



Abbildungen 19 a und b: Fraktogramme (a) und QF-Profile (b) für unterschiedliche, lineare Gradienten der Probe BAM N-001 (siehe auch Tabelle 7).

Tabelle 7: Parameter der in Abbildung 19 a wiedergegebenen Fraktogramme.

Messung	DF / mL min <sup>-1</sup>	IV / $\mu$ L	FZ / min	ÜZ / min	SF / mL min <sup>-1</sup>
1	1,5	100	3	3,0	0,85
2	1,5	20	3	3,0	0,85
3	1,5	200	10	0,5	0,78
4	1,5	100	10	0,5	0,78
5	1,5	100	10	0,5	0,78
6	1,5	100	10	0,5	0,78
7	1,5	100	10	0,5	0,78
8	1,0	100	10	0,5	0,84
9	1,0	100	10	0,5	0,84

Die in Abbildung 19 a dargestellten Fraktogramme verdeutlichen, dass unter Verwendung von linearen Gradienten eine höhere Auflösung erreicht werden kann. Für viele Gradienten (z.B.

Messung 6) ist zusätzlich ein Aggregatpeak nach der Elution des Hauptpeaks bei 20,6 min erkennbar. Da der Hauptpeak selbst für Gradienten mit einer geringen Trennkraft eine Schulter aufweist, deutet dies auf eine zumindest bimodale Verteilung der NP hin. Die höchste Auflösung konnte in Messung 8 erreicht werden, da in diesem Fall der Schulterpeak am weitesten von dem Hauptpeak getrennt werden konnte. Daher wurde dieser Gradient mit den in Tabelle 7 aufgeführten Parametern für weitere Messungen verwendet. Ein Vergleich des UV/Vis-Fraktogramms ( $\lambda_{430\text{ nm}}$ ) und des differentiellen Brechungsindexsignals ist in Abbildung 20 dargestellt.

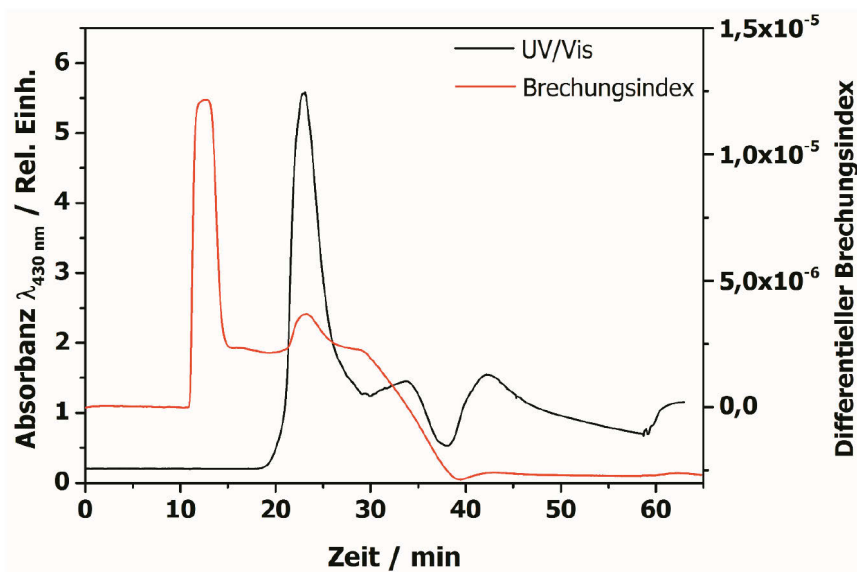
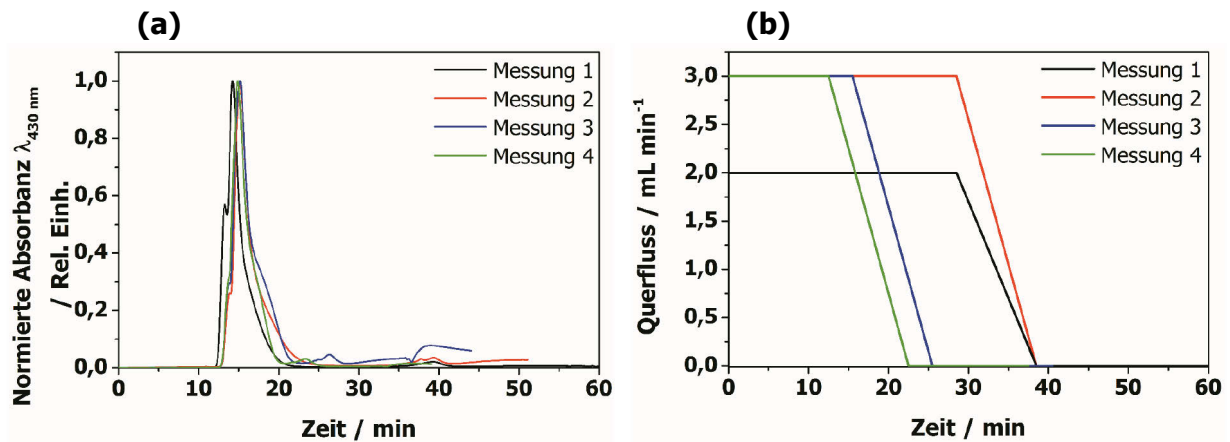


Abbildung 20: Vergleich der Fraktogramme des UV/Vis-Detektors ( $\lambda_{430\text{ nm}}$ ) und des differentiellen Brechungsindexsignals für Messung 8.

Das Signal des Brechungsindex-Detektors in Abbildung 20 zeigt druckabhängige Schwankungen der Basislinie, die u.a. bei dem Wechsel vom Fokussierungs- zum Elutionsmodus beobachtet werden. Zudem wurde ein intensiver Injektionspeak bei einer Retentionszeit von ca. 11-15 min detektiert. Der eigentliche Hauptpeak zeigt dagegen eine deutlich geringe Intensität im Vergleich zum UV/Vis-Signal. Für die weiteren Untersuchungen wurde daher ausschließlich das UV/Vis-Signal verwendet.

In einem weiteren Experiment wurde die Höhe des Spacers von 350  $\mu\text{m}$  auf 190  $\mu\text{m}$  verringert. Für diesen Versuch wurde ein IV von 100  $\mu\text{L}$ , eine Injektionszeit von 10 min, eine ÜZ von 0,5 min, ein DF von 1  $\text{mL min}^{-1}$  und ein STF von 0,84  $\text{mL min}^{-1}$  verwendet. In Abbildungen 21 a und b werden die erhaltenen Fraktogramme (a) und QF-Profile (b) gezeigt. Aus diesen sind im Vergleich zu den zuvor gezeigten Fraktogrammen deutlich schmalere Peaks zu erkennen. Zudem ist keine klare Trennung des NP-Peaks vom Injektions- bzw. Todvolumenpeak bei einer Retentionszeit von ca. 13-14 min erkennbar. In diesem Peak eluieren sehr kleine

und nicht ausreichend fokussierte Probenbestandteile. Als Folge dieser Ergebnisse wurde entschieden, weiter den 350  $\mu\text{m}$  Spacer zu verwenden.



Abbildungen 21 a und b: Fraktogramme (a) und QF-Profile (b) der Probe BAM N-001 unter Verwendung eines 190  $\mu\text{m}$  Spacers.

Ziel des nächsten Experimentes war eine Optimierung des Eluenten. Hierfür wurden die am häufigsten in der Literatur für die Analyse von Ag-NP beschriebenen Eluenten  $\text{NaN}_3$  [149],  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  [18], SDS [27, 150] und FL-70 [151, 152] untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Konzentrationen von 200  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$ , 1 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  mit pH 7,4, 0,01% SDS mit 200  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  und 0,005% FL-70 mit 200  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  verwendet. Deren Einfluss auf die Trennung, die Wiederfindungsraten, den Durchmesser (DLS) sowie das UV/Vis-Spektrum wurde untersucht. Die UV/Vis-Spektren der NP 1:10 mit den verschiedenen Eluenten verdünnt sind in Abbildung 22 wiedergegeben.

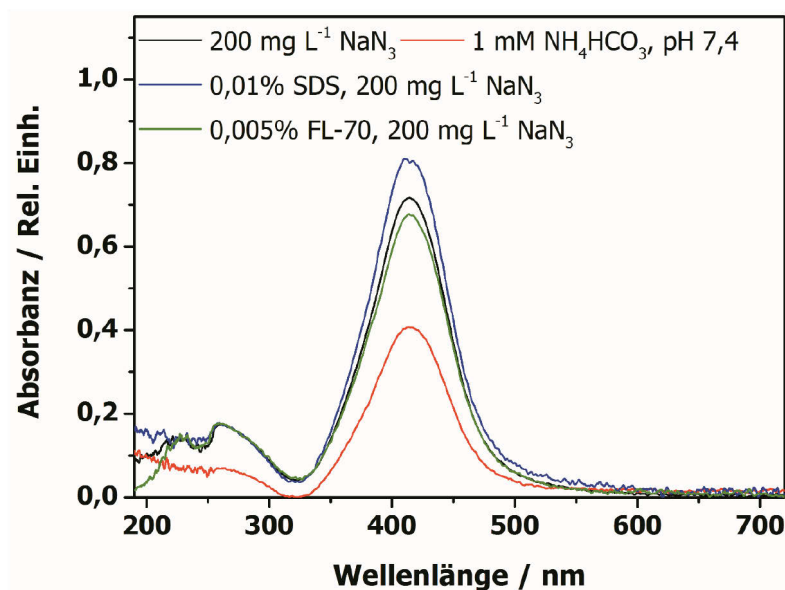
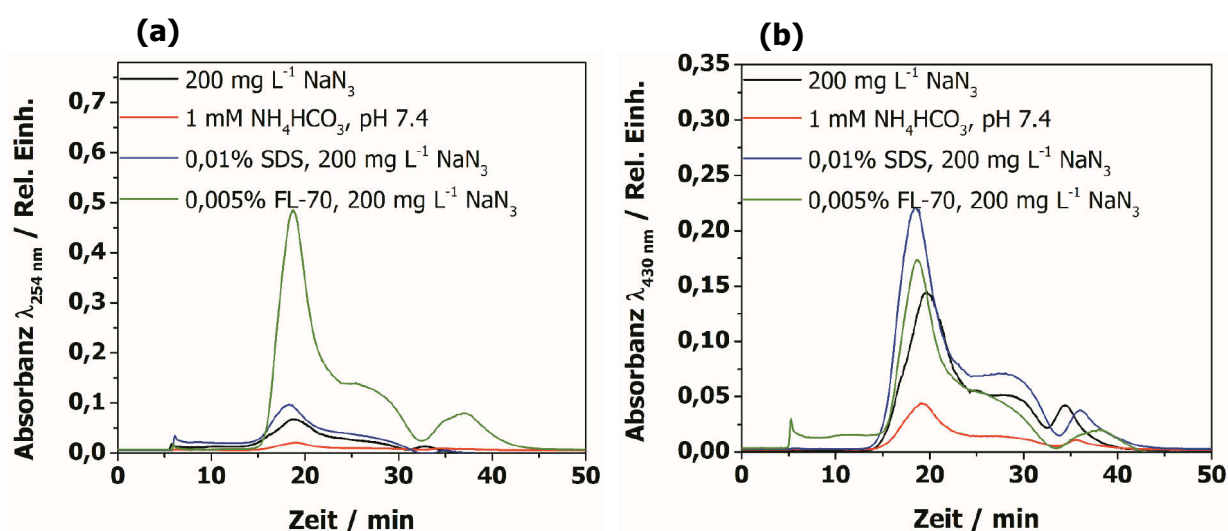


Abbildung 22: UV/Vis-Spektren der Probe Bam N-001, 1:10 in verschiedenen Eluenten.

Die Spektren in Abbildung 22 ergeben für gleiche Ag-Konzentrationen ein nahezu identisches Signal mit einem signifikanten Peakmaximum im Bereich von 320-500 nm, allerdings mit unterschiedlicher Intensität. Die Daten deuten somit auf einen Einfluss des Suspensionsmittels auf die Plasmonenresonanz hin. Für eine Wellenlänge von etwa 250-300 nm ist ein kleinerer Peak des Eluenten bzw. der NP-Stabilisatoren zu erkennen. Die dazugehörigen Fraktogramme sind aus Abbildungen 23 a ( $\lambda_{254\text{ nm}}$ ) und b ( $\lambda_{430\text{ nm}}$ ) ersichtlich.



Abbildungen 23 a und b: Einfluss des Eluenten auf die UV/Vis-Fraktogramme für  $\lambda_{254\text{ nm}}$  (a) und  $\lambda_{430\text{ nm}}$  (b), Probe BAM N-001.

Aus Abbildungen 23 a und b ist nur ein leichter Einfluss des Eluenten auf Retention der NP ableitbar. Das Peakmaximum für  $\lambda_{254\text{ nm}}$  ist unter Verwendung von SDS/NaN<sub>3</sub> leicht zu kürzeren Retentionszeiten verschoben. Wie in Tabellen 5 und 6 zuvor dargestellt, weist die Probe in diesem Eluenten ein deutlich höheres Zetapotential und einen etwas kleineren Durchmesser auf. Dieses könnte eine größere Abstoßung und Rückdiffusion der NP von der Membran und somit eine schnellere Elution erklären.

Für eine Detektorwellenlänge von  $\lambda_{430\text{ nm}}$  zeigt die Probe in den Eluenten NaN<sub>3</sub> und NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> zu höheren Retentionszeiten verschobene Peakmaxima. Da sich diese nicht vollständig durch das Zetapotential und den hydrodynamischen Durchmesser der NP allein erklären lassen, könnte der Eluent auch das Zetapotential der Membran beeinflussen, wie von Bendixen *et al.* gezeigt, was zu unterschiedlichen Partikel-Membran-Interaktionen führt. [153]

Die Fraktogramme weisen darüber hinaus deutliche Unterschiede in den Peakintensitäten auf. Bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{254\text{ nm}}$  absorbieren hauptsächlich organische Substanzen. Die Signale sind somit ein Maß für die Absorption der NP-Stabilisatoren Tween 20 und Tagat TO sowie der Eluenten SDS/NaN<sub>3</sub> und FL-70/NaN<sub>3</sub>. Die höchste Absorption zeigt der Eluent FL-70/NaN<sub>3</sub>, der aus einer Mischung aus Tetranatrium-Ethylendiamin-Tetraacetat, Natriumoleat, Natriumbicarbonat, Triethanolaminoleat, Wasser, PEG sowie mehreren Alkoholen

besteht. Die Suspension in  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  zeigt dagegen die geringste Intensität. Bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{430\text{ nm}}$  absorbieren die NP-Kerne. Signalunterschiede können hier mit einer vom Brechungsindex des Eluenten abhängigen Veränderung der Plasmonenresonanz begründet werden. [154] Eine Konzentrationsbestimmung ausschließlich mithilfe der UV/Vis-Spektren ist deshalb nicht möglich. Daher wurde hierfür die ICP-MS gewählt. Dazu mussten die in Abbildungen 23 a und b gezeigten Läufe mit einem Fraktionssammler fraktioniert werden. Die erhaltenen Fraktogramme sind in Abbildung 24 dargestellt. Hierbei wurde das Isotop  $^{107}\text{Ag}$  in einer *off-line* Messung zur Quantifizierung genutzt. Das dazugehörige Kalibrierkonzept wurde in Kapitel 4.4.4 erläutert.

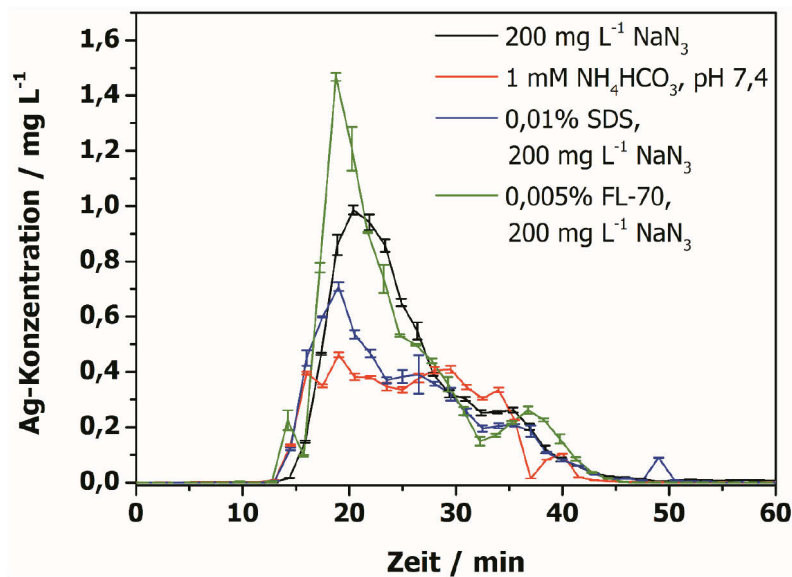


Abbildung 24: Einfluss verschiedener Eluenten auf das Fraktogramm der Ag-Konzentration (Bestimmung mittels ICP-MS).

Die Lage der Peaks in den ICP-MS-Fraktogrammen in Abbildung 24 stimmen gut mit den UV/Vis-Signalen in Abbildungen 23 a und b überein. Ähnliche Verschiebungen der Retentionszeit wurden zudem für die Eluenten  $\text{NaN}_3$  und  $\text{FL-70/NaN}_3$  gefunden. Für die Eluenten  $\text{SDS/NaN}_3$  und  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  wurden deutlich flachere Peakprofile detektiert. Letzterer Eluent zeigt einen breiten Peak ohne Maximum. Dieses könnte an einer unzureichenden Stabilisierung und somit einem Verbleib der NP in den Fraktionssammlergefäßen liegen.

Die aus Abbildung 24 erhaltenen Konzentrationen und Wiederfindungsraten sind in Tabelle 8 dargestellt. Diese zeigt für den Eluenten  $\text{FL-70/NaN}_3$  die höchsten Wiederfindungsraten von  $80 \pm 4\%$ . Dieser kann die NP sowohl sterisch wie auch elektrostatisch stabilisieren. Die Ag-Konzentration ist jedoch für den Eluenten  $\text{NaN}_3$  am höchsten. Dieses ist auf den während der Analyse mit  $\text{FL-70/NaN}_3$  ermittelten höheren DF im Vergleich zu den Experimenten mit den anderen Eluenten zurückzuführen. Kontaminationen im System oder eine mögliche Mizellbildung des Eluenten in der Kapillare, welche zur Regulierung der ST verwendet

wird, könnten zu einem geringen STF führen. Dieses führt dementsprechend zu einem höheren DF. Die gefundenen Werte für diesen Eluenten zeigten jedoch hohe relative Standardabweichungen von teilweise über 60% und mehrfach Messungen mit 0 cps im Konzentrationsbereich unter  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ . Ursache hierfür könnten Plasmainstabilitäten, polyatomare Interferenzen und Mizellbildung des Tensids sein. Daher wurde  $\text{NaN}_3$  für alle weiteren Messungen als Eluent ausgewählt.

Tabelle 8: Ag-Konzentrationen und Wiederfindungsraten der in Abbildung 24 gezeigten Fraktogramme unter Verwendung der vier unterschiedlichen Suspensionsmittel nach Integration. Je  $100 \mu\text{L}$  der Probe BAM N-001 wurden injiziert.

Eluent	Ag-Konzentration / $\mu\text{g L}^{-1}$	Wiederfindungsrate / %
200 $\text{mg L}^{-1}$ $\text{NaN}_3$	$204,7 \pm 1,8$	$40,8 \pm 0,4$
1 mM $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH 7,4	$118,7 \pm 2,8$	$28,5 \pm 0,7$
0,01% SDS, 200 $\text{mg L}^{-1}$ $\text{NaN}_3$	$134 \pm 6$	$32,3 \pm 1,5$
0,005% FL-70, 200 $\text{mg L}^{-1}$ $\text{NaN}_3$	$196 \pm 8$	$80 \pm 4$

Die geringen Wiederfindungsraten für  $\text{NaN}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  und  $\text{SDS}/\text{NaN}_3$  in Tabelle 8 deuten auf hohe Verluste hin. Diese können an den Wänden der vielen Gefäße (zwischen 45 und 49), durch den QF sowie durch Ablagerungen auf der Membran hervorgerufen werden. Daher wurden in einem weiteren Experiment der DF in einem einzigen Gefäß aufgefangen und der Gesamtgehalt an Ag mittels ICP-MS analysiert. Zudem wurden sowohl das IV als auch die FZ variiert, da beide möglicherweise einen signifikanten Einfluss auf die Wiederfindungsraten haben könnten. So kann eine lange FZ zu Verlusten von Probenbestandteilen mit kleinerem Molekulargewicht führen, welche durch die Membran eluieren [155], während eine zu hohe Injektionsmenge Überladungseffekte verursachen kann. [95] Die ermittelten Wiederfindungsraten für verschiedene IV von  $20 \mu\text{L}$ ,  $50 \mu\text{L}$ ,  $100 \mu\text{L}$  und  $200 \mu\text{L}$  bei jeweils drei unterschiedlichen FZ von 3 min, 5 min und 8 min sind in Abbildung 25 graphisch dargestellt. Aus dieser ist ersichtlich, dass mit Ausnahme der  $20 \mu\text{L}$  Messung für alle IV die höchste Wiederfindungsrate bei einer FZ von 5 min erhalten wurde. Dabei ist das Maximum für die IV  $50 \mu\text{L}$  und  $100 \mu\text{L}$  besonders ausgeprägt. Gründe für die geringeren Wiederfindungsraten können Probenverluste durch eine nicht optimale Fokussierung oder eine Interaktion mit der Membran und/oder den Kapillaren sein. Da die höchste Wiederfindungsrate von  $55,6 \pm 0,8\%$  für ein IV von  $100 \mu\text{L}$  bei einer Injektionszeit von 5 min gefunden wurde, wurden alle weiteren Analysen unter diesen Bedingungen durchgeführt. In Abbildung 26 sind beispielhaft die erhaltenen Frakto-



gramme für eine FZ von 5 min gezeigt. Hierfür konnten zwar signifikante Intensitätsunterschiede, jedoch keine Unterschiede im Peakprofil der Fraktogramme gefunden werden. Gleiches konnte auch in den Fraktogrammen mit FZ von 3 min und 8 min beobachtet werden.

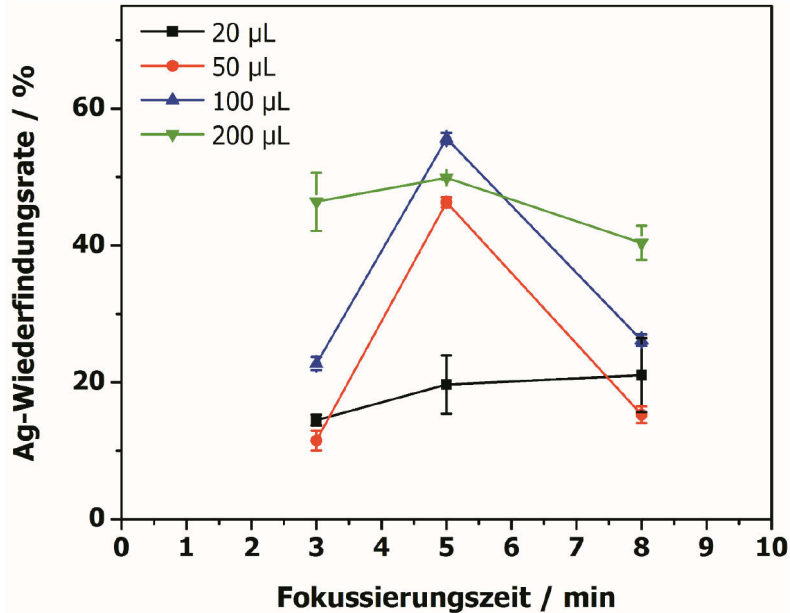


Abbildung 25: Einfluss des IV und der FZ auf die Wiederfindungsrate.

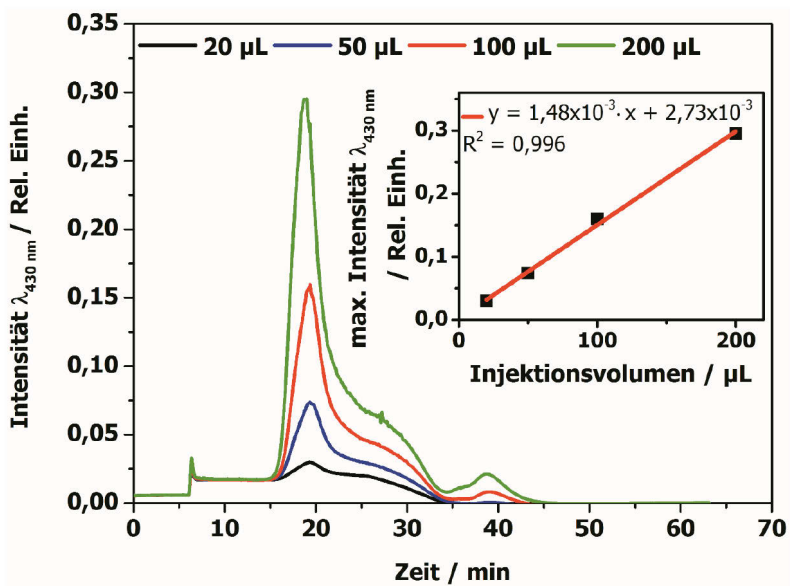


Abbildung 26: Vergleich der Fraktogramme mit den IV 20 µL, 50 µL, 100 µL und 200 µL, FZ 5 min.

Die Wiederfindungsrate von 56% aus Abbildung 25 bedeutet einen Probenverlust von 44%. In der Literatur werden als mögliche Ursache Verluste durch den QF [27], durch Aggregation [156] und auf der Membranoberfläche [27, 150, 157, 158] genannt. Um zu untersuchen, ob Ag im QF nachgewiesen werden kann, wurde diese neben dem DF, dem STF und dem SF

aufgefangen. In Tabelle 9 sind die ermittelten Konzentrationen sowie Wiederfindungsraten zusammengefasst.

Tabelle 9: Detektierte Ag-Konzentrationen und Wiederfindungsraten in den vier AF4-Flüssen.

Fluss	Absolute Ag-Konzentration / ng	Wiederfindungsrate / ‰
DF	3479 ± 52	55,7 ± 0,8
QF	0,75 ± 0,01	0,012 ± 0,001
STF	28,85 ± 0,29	0,462 ± 0,005
SF	1,55 ± 0,10	0,025 ± 0,002

Aus Tabelle 9 ist ersichtlich, dass die ermittelte Ag-Konzentration in QF und SF im Vergleich zum DF vernachlässigbar ist. Im STF wurde eine Wiederfindungsrate von etwa 0,5% Ag gefunden. Dieses könnte auf  $\text{Ag}^+$ -Ionen, nicht-fokussierte Probenbestandteile oder längliche NP, aufgrund ihrer Fähigkeit sich zu drehen, hindeuten. Diese könnten in den oberen Teil des laminaren Flussprofils gelangen und durch den STF mit einer Fließgeschwindigkeit von  $0,79 \text{ mL min}^{-1}$  vom DF abgetrennt werden. Jedoch ist die im STF gefundene Ag-Konzentration im Vergleich zur Wiederfindungsrate im DF und dem Gesamtverlust an Ag von ca. 44% nicht signifikant. Für die andern drei IV von 20  $\mu\text{L}$ , 50  $\mu\text{L}$  und 200  $\mu\text{L}$  sowie die FZ von 3 min und 8 min lagen die Wiederfindung in dem QF, STF und SF ebenfalls unter jeweils 0,5%.

Ein wesentlicher Parameter für die Trennung in der AF4 ist das Membranmaterial. Dazu wurden zwei, zur Analyse von Ag-NP am häufigsten verwendete Membranmaterialien PES und reg. Cellulose mit Porenausschlussgrößen von 5 kDa bzw. 10 kDa verglichen (siehe Abbildung 27). [46, 52, 159, 160]

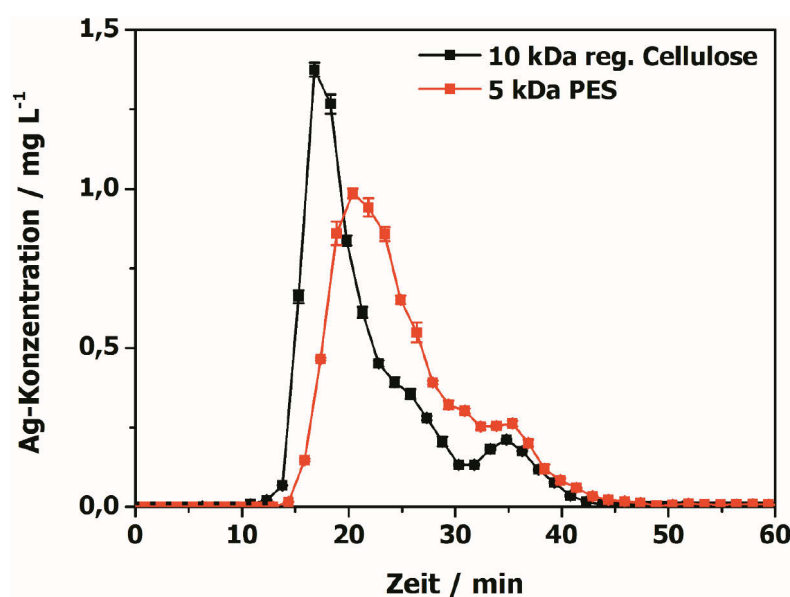


Abbildung 27: Vergleich einer 5 kDa PES- und einer 10 kDa reg. Cellulose-Membran.

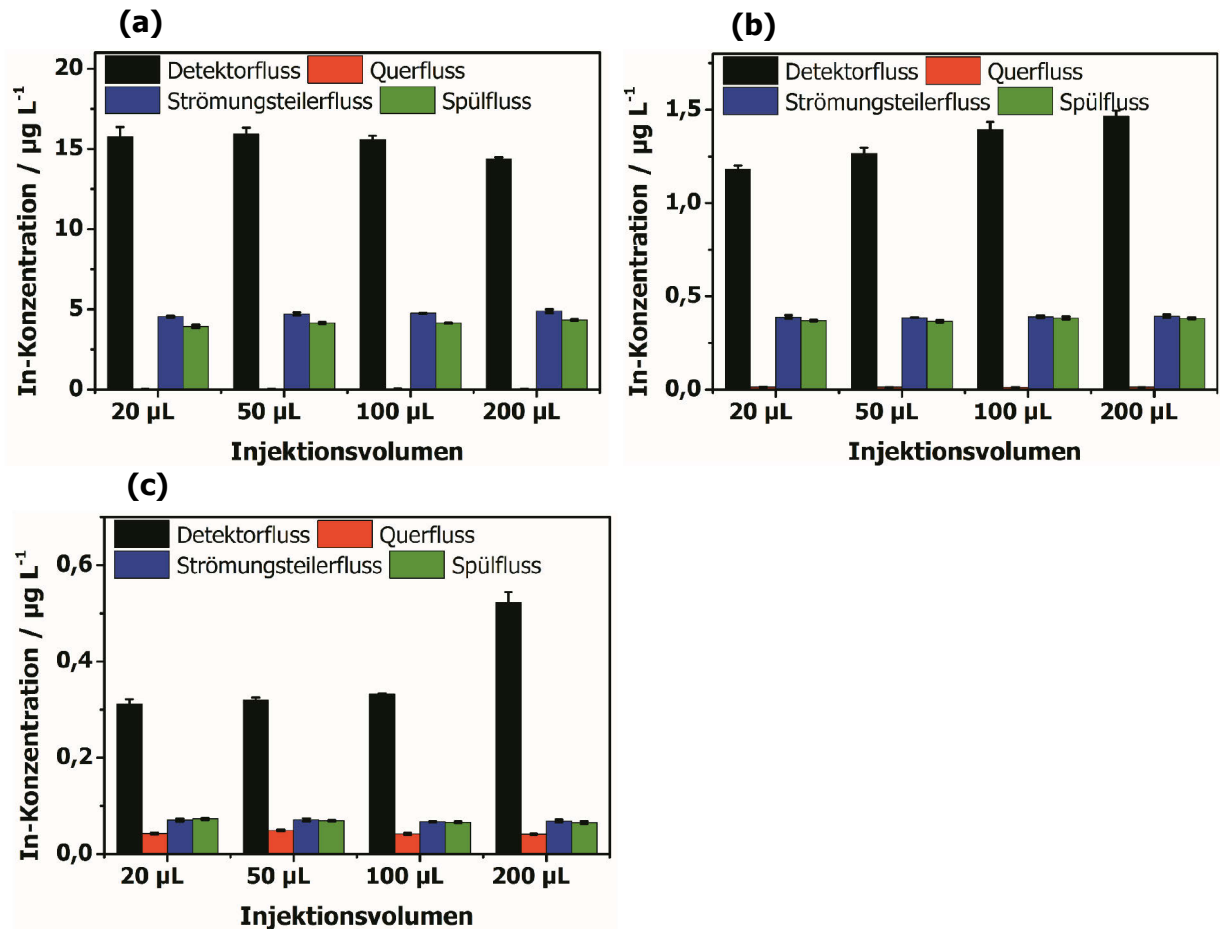
Die in Abbildung 27 dargestellten Ag-Konzentrationen zeigen für die 10 kDa reg. Cellulose-Membran eine Elution bei etwas kürzeren Retentionszeiten und einen deutlich schmalen Peak bei gleichzeitig höherer Wiederfindungsrate von  $67,9 \pm 1,7\%$  Ag. Letztere könnte sowohl auf das Membranmaterial als auch auf die größere Porenausschlussgröße zurückzuführen sein. Da die 5 kDa PES-Membran jedoch eine etwas stärkere Retention des Peakmaximums zeigte, wurde mit dieser Membran fortgefahren. [10]

#### 5.4.2 Verwendung eines internen Standards

Die gravimetrische Analyse der gefüllten Fraktionssammlergefäße zeigte, dass deren Inhalt um bis zu 7,5% schwankte. Das könnte aufgrund der manuellen ST durch Druckänderungen im AF4-Kanal z.B. durch den Wechsel vom Fokussierungs- zum Elutionsschritt verursacht werden. Um diese sowie mögliche Geräteschwankungen auszugleichen, wurde den Fraktionen  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  La als interner Standard hinzugegeben.

Zum Vergleich wurde eine In-Standardlösung ( $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ), die als interner Standard direkt dem AF4-Eluenten zugesetzt wurde, untersucht. Diese könnte Schwankungen im DF direkt ausgleichen und die Vorbereitungszeit der Fraktionen für die ICP-MS verkürzen. In Abbildungen 28 a-c sind die detektierten In-Konzentrationen für FZ von 3 min (a), 5 min (b) und 8 min (c) dargestellt. Überraschenderweise führte die Zugabe einer In-Standardlösung zum AF4-Eluenten zu keiner gleichmäßigen In-Verteilung in den vier Flüssen. Die höchste Konzentration wurde im DF und die niedrigste im QF gefunden. Die Daten legen nahe, dass das In die Poren der Membran aufgrund von Interaktionen mit dieser nicht passieren kann oder in den Kapillaren bzw. den QF-Pumpen-Spritzen adsorbiert bleibt. Selbst ein starker STF von  $3 \text{ mL min}^{-1}$  ist nicht in der Lage, die im Kanal verbliebenen und möglicherweise mit der Membranoberfläche assoziierten  $\text{In}^+$ -Ionen zu lösen. In dem oberen Teil des Kanalfusses, welcher über den STF abgeleitet wird, kann ebenfalls nur wenig In nachgewiesen werden. Dies legt nahe, dass sich die  $\text{In}^+$ -Ionen ähnlich wie die NP verhalten und sich ebenfalls im unteren Teil des Kanals befinden. Darauf deutet auch die vergleichsweise hohe In-Konzentration im DF von etwa  $16 \mu\text{g L}^{-1}$ , die deutlich über der eingesetzten Konzentration von  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  liegt, hin. Dies spricht für eine Aufkonzentrierung. Innerhalb der Messreihen (3-8 min) stimmen die einzelnen In-Konzentrationen gut überein. Zwischen den Messreihen kann jedoch ein Absinken der Werte von Abbildung 28 a über b zu c beobachtet werden. Dieses entspricht der Messreihenfolge und bedeutet, dass das In in der  $200 \text{ mg L}^{-1} \text{ NaN}_3$ -Lösung über einen Zeitraum von mehreren Tagen unzureichend stabilisiert wird. Mögliche Ablagerungen von In an den Oberflächen der Eluentengefäße sind allerdings vernachlässigbar, da die Konzentration des internen Standards lediglich innerhalb eines Experimentes konstant sein muss. Aufgrund der ungleichen Verteilung von In im System wurde diese Art der Normierung nicht weiterverfolgt. Im weiteren

Verlauf dieser Arbeit sollte eine mögliche Ablagerung des In auf der Membranoberfläche mittels LA-ICP-MS überprüft werden. [10]



Abbildungen 28 a-c: In-Konzentration in den vier AF4-Flüssen bei Injektionszeiten von 3 min (a), 5 min (b) und 8 min (c).

#### 5.4.3 Laserablation-ICP-MS von Probenverlusten auf der Membran

Um die bereits mehrfach erwähnte mögliche Adsorption der Probe auf der Membran zu untersuchen und zu lokalisieren, wurden LA-ICP-MS-Experimente durchgeführt. Dazu wurde eine 5 kDa PES-Membran, welche für vier AF4-Analysen mit einer absoluten Injektionsmenge von 25 µg Ag verwendet wurde, in drei Teile zerschnitten und in mehreren, aufeinanderfolgenden Experimenten analysiert. Generelle Herausforderungen in der LA-ICP-MS sind mögliche Geräteschwankungen aufgrund der langen Analysendauer und die Quantifizierung. Potentielle Geräteschwankungen wurden dahingehend untersucht, ob das <sup>13</sup>C-bzw. <sup>115</sup>In-Signal, welches als interner Standard dem AF4-Eluenten zugegeben war (siehe Abbildungen 28 a-c), in einem konstanten LA-ICP-MS-Signal der gescannten AF4-Membran resultierte. Abbildung 29 stellt die erhaltenen Intensitätsprofile für <sup>13</sup>C, <sup>107</sup>Ag und <sup>115</sup>In sowie ein Foto der ablatierten Membran dar. Zusätzlich wurden die Kanalgrenzen und die Position der ein- und ausgehenden Flüsse eingezeichnet.

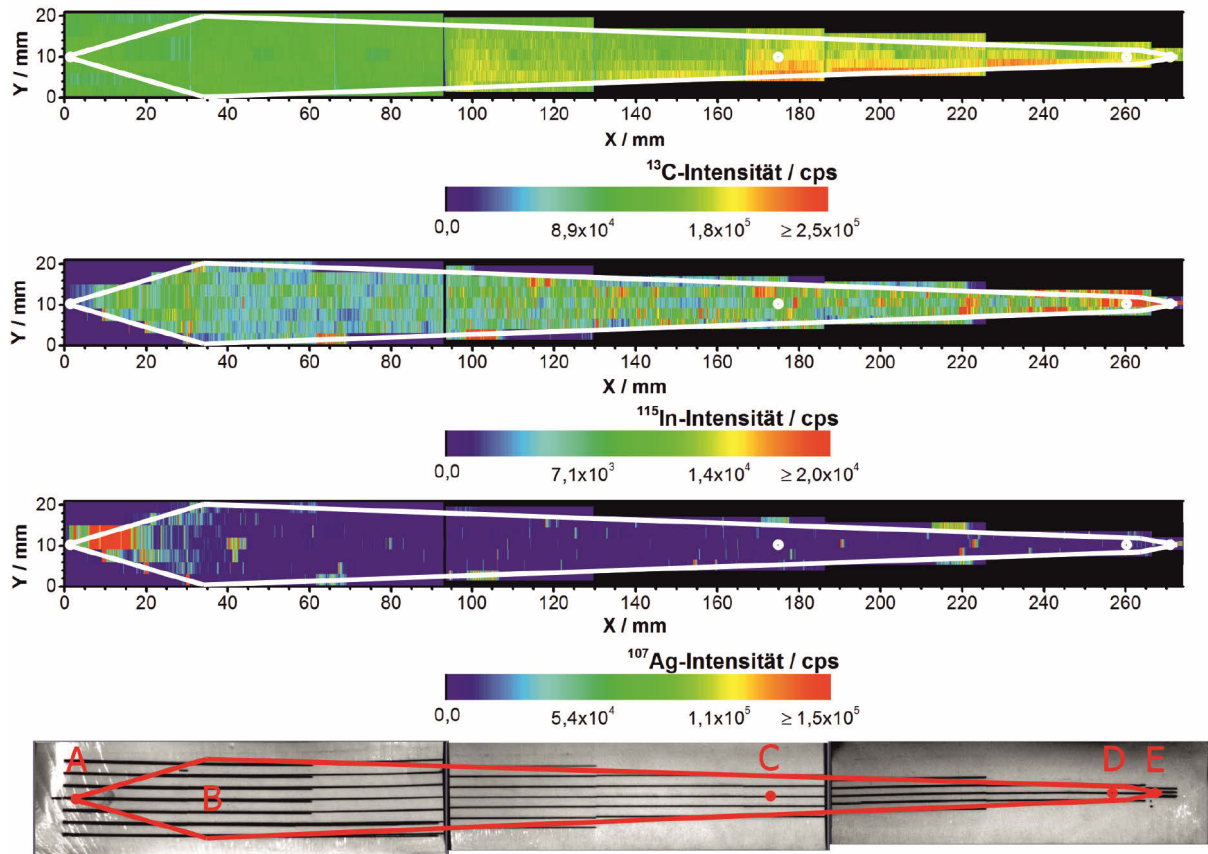


Abbildung 29: LA-ICP-MS-Konturplots einer AF4-Membran für die Isotope  $^{13}\text{C}$ ,  $^{115}\text{In}$  und  $^{107}\text{Ag}$  sowie ein Foto der ablatierten Membran. Markierungen auf dem Membranfoto zeigen den Ort der Probeninjektion (A), Fokussierung (B), den Einlass des Fokussierungsflusses (C) sowie den Auslass des STF (D) und DF (E).

Aus Abbildung 29 geht hervor, dass das  $^{13}\text{C}$ -Signal im ersten Teilstück der Membran, welches den Injektions- und Fokussierungspunkt beinhaltet, nahezu konstant bleibt. Ab dem mittleren und insbesondere auf dem hinteren Teil der Membran kann jedoch ein Anstieg beobachtet werden. Dieses könnte durch Gerätedriften, Inhomogenitäten der Membran oder einen veränderten Laserfokus verursacht werden. Letzteres könnte durch eine nicht vollständig plane Membran, welche sich beim Trocknen leicht an den Rändern nach oben biegt, ausgelöst werden. Die Verteilung des  $^{115}\text{In}$ -Signals auf der Membran weist ebenfalls starke Inhomogenitäten auf. Auch auf der Membran konnte somit keine gleichmäßige Verteilung des In-Zusatzes im AF4-Eluenten gefunden werden. Mögliche Ursachen könnten Inhomogenitäten der Membran oder ein ungleichmäßiges Abpumpen des QF, der im Bereich der Probeninjektion (A) erfolgt, sein. Aufgrund dieser Schwierigkeiten wurde auf die Verwendung eines internen Standards für weitere LA-ICP-MS-Experimente verzichtet.

Im Gegensatz zu diesen beiden Elementen wurden hohe Ag-Signale besonders im Bereich der Probeninjektion (A), der Fokussierung (B) und am Kanalrand nachgewiesen. Somit konnte

die in der Literatur beschriebene Vermutung des Verlustes auf der Membran bestätigt werden. [27, 150, 157, 158] Im Folgenden (Kapitel 5.4.5) sollten die offensichtlichen Ag-Ablagerungen auf der Membran quantifiziert werden, um die Signifikanz dieser Verluste zu untersuchen. [10]

#### 5.4.4 *On-line* Charakterisierung von BAM N-001 mit der AF4-ICP-MS

Um den in Kapitel 5.4.1 beschriebenen Probenverlust auf den Gefäßoberflächen in der Fraktionssammlung zu vermeiden sowie die Analysenzeit drastisch zu verkürzen, wurde eine *on-line* Kopplung der AF4 und der ICP-MS untersucht. Für die Quantifizierung wurde die FIA gewählt. Hierfür wurde ein 6-Wege-Ventil verwendet. Die Schleife, welche zur Injektion der wässrigen Ag-Standardlösung verwendet wurde, hatte ein Volumen von  $11,53 \pm 0,80 \mu\text{L}$ .

Als Eluent wurde Reinstwasser eingesetzt, da hohe Salzkonzentrationen zu Ablagerungen an den Konen des ICP-MS und dadurch zu einem Empfindlichkeitsverlust führen können. Die Probenkonzentration spielt in Bezug auf Überladungseffekte eine wichtige Rolle. [95] Da die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Optimierung der FZ und des IV (siehe Abbildung 25) keine Veränderungen im Fraktogramm zeigte, wurden Überladungseffekte für die hier untersuchten Messbedingungen ausgeschlossen. Für die AF4-ICP-MS-Kopplung war jedoch eine Reduktion der absolut injizierten Ag-Menge notwendig, um nicht den Detektor zu überladen. Die FZ wurde daher auf 3 min reduziert. Dabei wurden 10 Fraktogramme der Probe BAM N-001 mit einer absoluten Injektionsmenge an 2,5 ng Ag pro Experiment (siehe Abbildung 30) bzw. an 31,3 ng Ag pro Experiment (siehe Abbildung 31) aufgezeichnet.

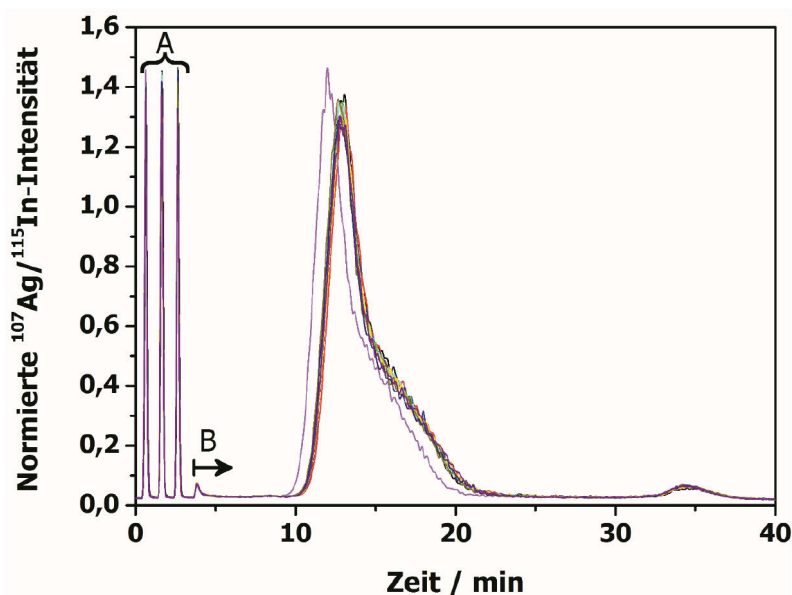


Abbildung 30: Auf In normierte Fraktogramme der Probe BAM N-001; 10-fach Ansatz; absolute injizierte Menge von 2,5 ng Ag pro Experiment; Quantifizierung mittels drei FIA-Peaks zwischen einer Retentionszeit von 0 min und 3 min (A); Elutionsstart der Probe nach 3,5 min (B); 5-Punkte-Mittelwertglättung.

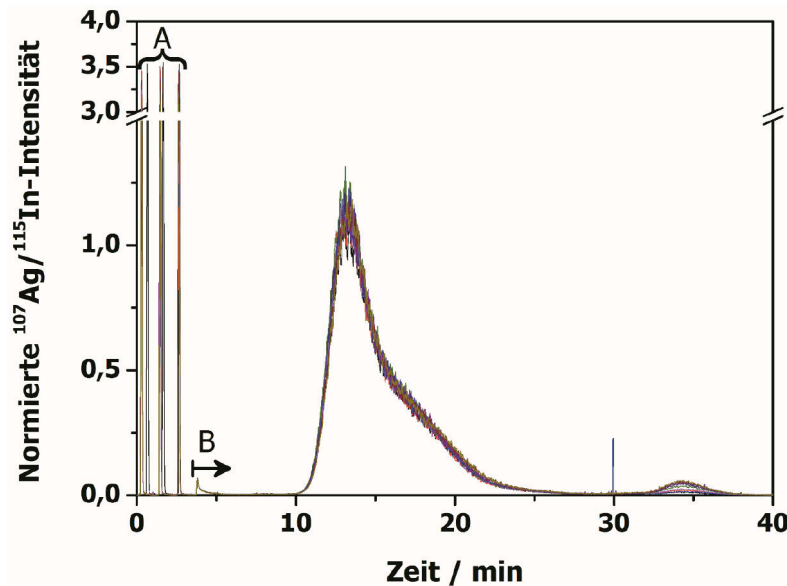


Abbildung 31: Auf In normierte Fraktogramme der Probe BAM N-001; 10-fach Ansatz; absolute injizierte Menge von 31,3 ng Ag pro Experiment; Quantifizierung mittels drei FIA-Peaks zwischen einer Retentionszeit von 0 min und 3 min (A); Elutionsstart der Probe nach 3,5 min (B); 5-Punkte-Mittelwertglättung.

Ein Vergleich der *off-line* (Abbildung 27) und *on-line* (Abbildungen 30 und 31) AF4-ICP-MS-Experimente zeigt ähnliche Fraktogramme. Das Experiment in Abbildung 30 wurde insgesamt dreimal wiederholt. Auch für diese Experimente wurden ähnliche Fraktogramme erhalten. Für die *on-line* Analysen wurde trotz des instabileren Zetapotentials des Reinstwassers von  $-18,0 \pm 1,3$  mV im Gegensatz zu  $-28,3 \pm 2,7$  mV für  $\text{NaN}_3$  (siehe Tabelle 5) nur ein geringer Anteil an Aggregaten/Agglomeraten detektiert. Für die in Abbildungen 30 und 30 dargestellten Fraktogramme konnte gezeigt werden, dass die Probe auch unter Verwendung eines Eluenten mit einem leicht positiveren Zetapotential sehr stabil ist und nur sehr wenig Aggregation/Agglomeration auftritt.

In einer Messung in Abbildung 30 erfolgte die Elution bei etwas kürzeren Retentionszeiten, wobei in diesem Fall von einem statistischen Ausreißer ausgegangen wird.

Die Wiederholbarkeit der Retentionszeiten, detektierte Konzentrationen, Wiederfindungsraten und Nachweisgrenze für Abbildungen 30 und 31 sind in Tabelle 10 wiedergegeben. Wie aus Tabelle 10 und Abbildungen 30 und 31 zu erkennen ist, führte die Reduktion der injizierten Menge an Ag und der FZ, die Vermeidung von Verlusten im Fraktionssammler sowie der Wechsel des Eluenten für die *on-line* AF4-ICP-MS-Messungen zu einer deutlichen Erhöhung der Wiederfindungsraten im Vergleich zu den *off-line* Experimenten. Zudem wurde eine gute Wiederholbarkeit der Retentionszeiten erreicht. Ähnliche Konzentrationen und Wiederfindungsraten wurden für beide Membranen ermittelt. Aufgrund der geringen Ag-Menge

wurde eine niedrigere NWG für Membran 1 erhalten. Die zuvor genannten Ergebnisse konnten in zwei Wiederholmessungen für Membran 1 bestätigt werden.

Tabelle 10: Analytische Güteziffern für die Fraktogramme in Abbildungen 30 und 31.

Parameter	Membran 1	Membran 2
Injizierte Gesamtmenge an Ag über 10 Experimente / ng	25,0	312,6
Retentionszeit / min	12,78 ± 0,30	13,21 ± 0,10
Detektierte Konzentration / mg L <sup>-1</sup>	56,2 ± 1,1	54,4 ± 2,7
Wiederfindungsrate / %	89,9 ± 1,8	87 ± 5
NWG / µg L <sup>-1</sup>	0,25 ± 0,01	0,47 ± 0,03

Einige Studien zeigen, dass die Membran vor der Analyse der eigentlichen Proben mit hohen Probenkonzentrationen konditioniert werden muss, da die Wiederfindungsraten während der ersten Messungen ansteigen, bevor konstante Werte erhalten werden können. [18, 45, 157] Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden, da lediglich für eine der insgesamt vier Membranen (inklusive Wiederholmessungen) ein leichter Anstieg nachgewiesen wurde. Für diese Experimente wurden jeweils neue Membranen, welche lediglich mit 20% MeOH über Nacht und dem Eluenten Reinstwasser equilibriert wurden, verwendet.

Eine Reduktion der injizierten Ag-Menge, der FZ, das Wechseln des Eluenten und die direkte Kopplung der AF4 und des ICP-MS führte zu hohen Wiederfindungsraten von 89,9 ± 1,8% und 87 ± 5% für die in Abbildungen 30 und 31 verwendeten Membranen. Der aus den Fraktogrammen ermittelbare Verlust (Injektionspeak bei ca. 3,8 min und Aggregate/Agglomerate bei ca. 34 min) ist jedoch deutlich geringer als die Differenz von ca. 10%. [10]

### 5.4.5 Probenverluste im AF4-System

Um einen möglichen Verlust im AF4-System zu untersuchen, wurden Experimente ohne QF und durch Überbrückung des AF4-Kanals durchgeführt. Dabei wurden Wiederfindungsraten von 88,1 ± 2,8% und 92,9 ± 2,7% erhalten. Ein Verlust durch das Anlegen des QF kann somit als nicht signifikant betrachtet werden. Aus der Differenz des Wertes der Kanalüberbrückung und der Wiederfindungsrate in Tabelle 10 ergibt sich ein Verbleib von 4,8% Ag im AF4-System inklusive dem Kanal, selbst wenn keine Trennkraft anliegt. [10]

### 5.4.6 Quantifizierung von Ag-Rückständen auf der AF4-Membran mittels Laserablation-ICP-MS

Wie in Abbildung 29 gezeigt ist, konnte mittels LA-ICP-MS die Ablagerung von NP auf der Membran nachgewiesen werden. Zur Quantifizierung wurden daher die in Abbildungen 30 und 31 verwendeten Membranen vollständig ablatiert. Der dafür zuerst verwendete Ansatz des



Einsatzes eines internen Lu-Standards erwies sich als nicht praktikabel, da die Lu-Spots deutlich größer als die NP-Spots waren und damit eine homogene Verteilung und ein ähnliches Verhalten des Lu und der NP nicht garantiert werden konnte.

In Abbildung 32 ist der LA-ICP-MS-Konturplot für eine Tropfenkalibrierung mit unterschiedlichen  $^{107}\text{Ag}$ -Konzentrationen dargestellt.

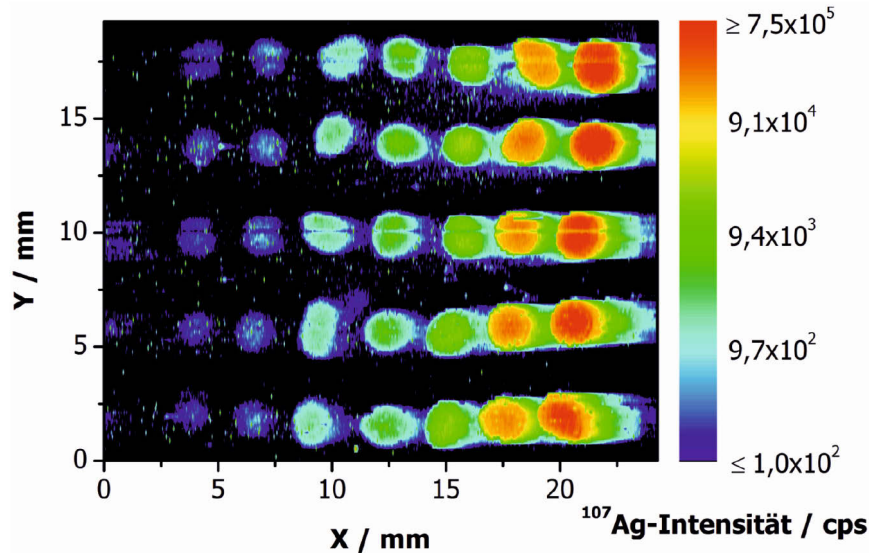


Abbildung 32: Tropfenkalibrierung mit unterschiedlichen Ag-NP-Konzentrationen für die LA-ICP-MS.

Der Blindwert (bei ca. 1,5 mm) kann in Abbildung 32 kaum vom Untergrundsignal unterschieden werden. Die Auftragung der Ag-Menge gegen die erhaltenen, integrierten Intensitäten ergab die Kalibriergerade in Abbildung 33 mit einem Bestimmtheitsmaß  $R^2$  von 0,988 und einer NWG von 4,2 pg absolut.

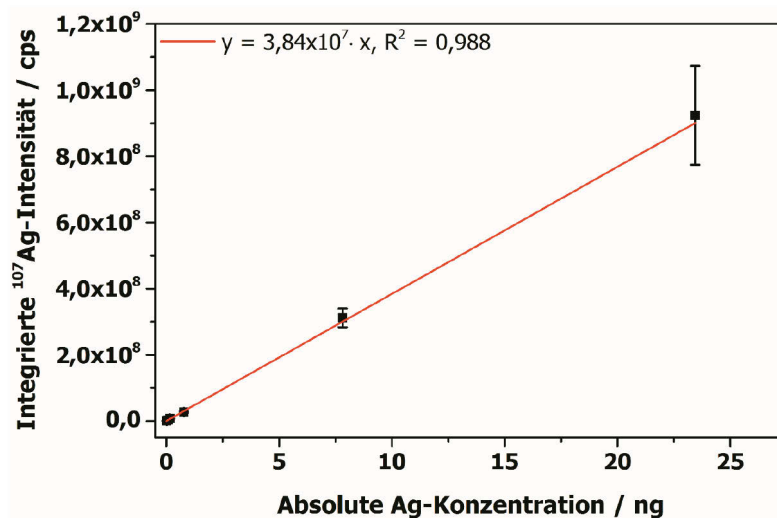
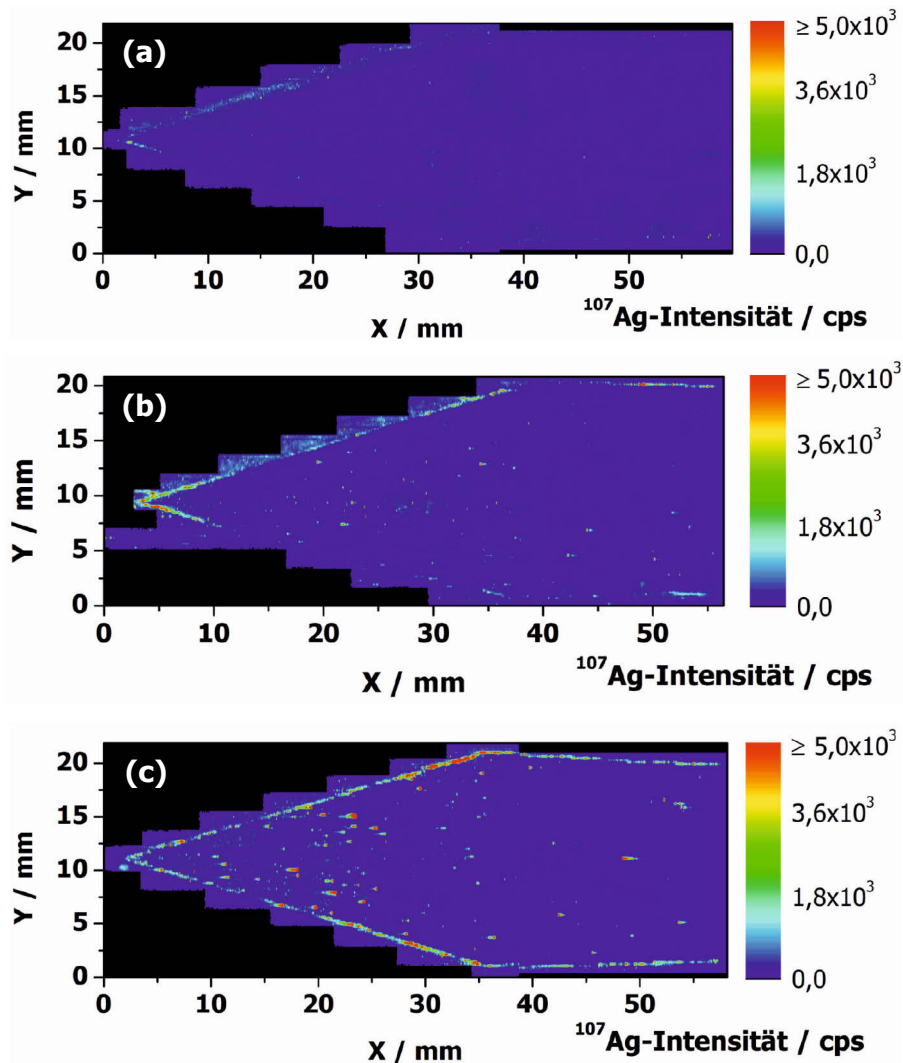


Abbildung 33: Kalibriergerade für die LA-ICP-MS.

Auf der Membran in Abbildung 29 wurden die höchsten Ag-Intensitäten im vorderen Bereich der Membran nahe der Stelle der Injektion gemessen. Daher wurde zur Quantifizierung des Ag-Rückstandes auf der Membran lediglich der vordere Teil vollständig ablatiert. Um den Einfluss der Konzentration auf die mögliche Ablagerung zu untersuchen, wurden eine Blindwertmembran sowie zwei Membranen mit unterschiedlicher injizierter Menge an Ag untersucht. In Abbildungen 34 a-c sind die mittels LA-ICP-MS gemessenen Konturplots der Blindwertmembran (a) sowie von zwei Probenmembranen mit einer injizierten Menge von 25,0 µg Ag (Membran 1, b) bzw. 312,6 µg Ag (Membran 2, c) über zehn AF4-Experimente dargestellt.



Abbildungen 34 a-c: Ablation einer Blindwertmembran (a) sowie Membranen mit einer injizierten Menge von 25 µg Ag (Membran 1, b) und 313 µg Ag (Membran 2, c); je zehn AF4-Experimente.

Aus Abbildungen 34 a-c ist erkennbar, dass auf der Blindwertmembran nur minimale Ag-Spuren durch Kontaminationen vorheriger Messungen im AF4-System gefunden werden können. Beide Probenmembranen zeigen die höchste  $^{107}\text{Ag}$ -Signalintensität an der Kanalbegrenzung. Während der Fokussierung der Probe wird ein Injektionsfluss von 0,2 mL min<sup>-1</sup>,

ein Fokussierungsfluss von  $2,8 \text{ mL min}^{-1}$  und ein QF von  $2 \text{ mL min}^{-1}$  verwendet. Diese Kombination an Flüssen führt zu einer Rückströmung der Probe zum Kanalrand. Der QF zieht parallel die NP in Richtung Membran. Diese Rückströmung könnte somit die Ag-Ablagerungen am Kanalrand erklären. Membran c zeigt zudem einzelne punktartige Ag-Rückstände, welche vermutlich durch Inhomogenitäten der Membranoberfläche verursacht werden. Diese Daten stimmen gut mit dem Ergebnis der Ablation der gesamten Membran in Abbildung 29 überein. Ein punktförmiger Rückstand am Fokussierungspunkt, wie in Abbildung 29 dargestellt, ist jedoch nicht erkennbar.

Die detektierten Ag-Konzentrationen und Wiederfindungsraten nach der Blindwert- und Untergrundkorrektur sind in Tabelle 11 getrennt für den Kanalrand und die innere Membranfläche angegeben.

Tabelle 11: Detektierte Ag-Konzentrationen pro Flächeneinheit und absolute Ag-Mengen auf den AF4-Membranen.

Parameter	Membran 1	Membran 2
Ag-Konzentration Kanalrand / $\text{pg mm}^{-2}$	1,61	10,85
Ag-Konzentration Kanalmitte / $\text{pg mm}^{-2}$	0,15	1,10
Menge Ag Kanalrand / ng	0,41	1,10
Menge Ag Kanalmitte / ng	0,05	0,71
Gesamtmenge Ag / ng	0,46	1,81
Wiederfindungsrate / %	1,84	0,58

Auf der Membran wurden Ag-Rückstände mit Wiederfindungsraten von 1,84% (Membran 1) bzw. 0,58% (Membran 2) nachgewiesen, wie Tabelle 11 auflistet. Im Vergleich zur Wiederfindungsrate im DF sind Verluste auf der Membran für das untersuchte Probensystem für die gewählten AF4-Methode in diesem Teil der Membran somit vernachlässigbar.

Die zweite injizierte Menge an Ag ist für Membran 2 12,5-fach höher als für Membran 1. Die in Tabelle 11 wiedergegebenen Ag-Mengen in der Kanalmitte und am Kanalrand liegen 6,74- bzw. 7,34-fach höher als für Membran 1. Somit konnte für diese Probe ein von der injizierten Probenmenge abhängiger Verlust auf der Membran detektiert werden. [10]

#### 5.4.7 Einfluss des Gehaltes an $\text{Ag}^+$ -Ionen auf die AF4-Analyse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde beobachtet, dass  $\text{Ag}^+$ -Ionen, wenn die Lösung nicht angesäuert oder anderweitig stabilisiert werden, in Lösungen instabil sind und mit PEEK- und Stahl-Kapillaren sowie Oberflächen von Probengefäßen und AF4-Membranen interagieren können. Daher wurden  $100 \text{ }\mu\text{L}$  eine wässrige Ag-Standardlösung mit einer Konzentration von  $10 \text{ mg L}^{-1}$  Ag unter *off-line* AF4-ICP-MS-Bedingungen in die AF4 injiziert und alle vier ausgehenden Flüsse

aufgefangen. In Tabelle 12 sind die erhaltenen Konzentrationen und die Wiederfindungsraten dargestellt.

Tabelle 12: Detektierte Ag-Konzentrationen und Wiederfindungsraten für eine wässrige Ag-Standardlösung mit einer Konzentration von  $10 \text{ mg L}^{-1}$  und einem IV von  $100 \text{ }\mu\text{L}$  in dem DF, QF, SF und STF.

Fluss	Ag-Konzentration / $\mu\text{g L}^{-1}$	Ag-Wiederfindungsrate / %
DF	$42,2 \pm 1,6$	$0,42 \pm 0,02$
QF	$32,7 \pm 0,9$	$0,33 \pm 0,01$
PF	$32,0 \pm 1,6$	$0,32 \pm 0,02$
STF	$505 \pm 9$	$5,05 \pm 0,09$
<b>Gesamtwiederfindung</b>		<b><math>6,12 \pm 0,13</math></b>

Aus Tabelle 12 ist zu erkennen, dass nur  $6,12 \pm 0,13\%$  des Ag aus dem System eluiert. Der größte Teil verbleibt in dem System. Für den STF wurde die höchste Wiederfindungsrate von  $5,05 \pm 0,09\%$  gefunden. Dieses deutet darauf hin, dass ein kleiner Teil des gelösten Ag in der Lage ist, in den oberen Flussbereich zu diffundieren, der durch den ST abgetrennt wird.

Basierend auf diesem Ergebnis wird für  $\text{Ag}^+$ -Ionen, welche in den Ag-NP Proben enthalten sind, unter unzureichender Stabilisierung ein ähnliches Verhalten erwartet. Ähnliches wurde, wie in Abbildung 28 a-c gezeigt, bereits für eine wässrige In-Standardlösung, die dem Eluenten zugegeben wurde, beobachtet. Der Gehalt an  $\text{Ag}^+$ -Ionen der Probe BAM N-001 wurde daher mittels Ultrafiltration bestimmt. Es wurde eine Porengröße von  $10 \text{ kDa}$  ausgewählt, dieses entspricht etwa einem Partikeldurchmesser von  $3 \text{ nm}$ . [161] Der Stokessche und hydrodynamische Durchmesser von  $\text{Ag}^+$ -Ionen ist  $2,96 \text{ }\text{\AA}$  bzw.  $6,81 \text{ }\text{\AA}$ . Die Ionen sollten somit in der Lage sein, die Poren der Membran passieren zu können. [162]

In dem Filtrat wurde eine Konzentration von  $4,94 \pm 0,08 \text{ mg L}^{-1}$  bzw. eine Wiederfindungsrate von  $7,9 \pm 0,1\%$  Ag gefunden. Für Wiederfindungsraten von  $89,9 \pm 1,8\%$  im DF der injizierten Ag-NP Menge von  $25,0 \text{ }\mu\text{g}$  (siehe Abbildung 30 und Tabelle 10) und einen Systemverlust von  $4,83\%$  Ag (Kapitel 5.4.4) scheint der Verlust durch die  $\text{Ag}^+$ -Ionen in der AF4 die wichtigste Quelle für die geringen Wiederfindungsraten zu sein. Dieser Wert konnte im QF (siehe Tabelle 9, Kapitel 5.4.1) und auf der Membran (siehe Tabelle 11, Kapitel 5.4.5) jedoch nicht detektiert werden. Daher wird angenommen, dass die Ionen in der Keramikfritte des AF4-Kanals verbleibt. [10]

#### 5.4.8 Vergleich des zertifizierten Durchmessers mit den AF4-Werten

Eine Größenkalibrierung mittels AF4 sollte idealerweise mit Referenzmaterialien mit bekannter Größe, welche der Probe auch in der Zusammensetzung entsprechen, durchgeführt werden. Da das einzige größenzertifizierte Ag-NP-Referenzmaterial im Rahmen dieser Arbeit als Probe

betrachtet wurde, fehlen geeignete Standards zur Größenbestimmung. Studien haben gezeigt, dass PS-NP-Standards erfolgreich zur Kalibration der Größe verwendet werden können. [152, 153] Die UV/Vis-Spektren der PS-NP sind in Abbildung 35 dargestellt.

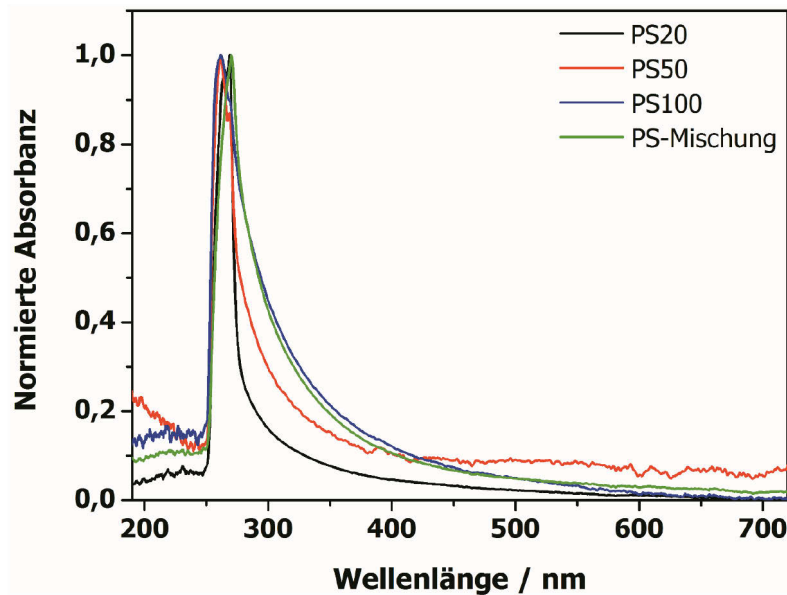


Abbildung 35: UV/Vis-Spektrum der PS-Standards mit Maxima bei 262 nm (PS 46 nm und PS 102 nm) sowie 269 nm (PS 20 nm) und 270 nm (PS-Mischung).

Aufgrund der Spektren in Abbildung 35 wurden die PS-Standards im weiteren Verlauf bei einer Wellenlänge von 254 nm analysiert.

Abbildung 36 stellt die Trennung eines Gemisches der drei PS-NP-Standards, die daraus resultierende Größenkalibrierkurve, das Fraktogramm der Probe BAM N-001 sowie den verwendeten QF-Gradienten dar. Für die BAM N-001 NP wurde in Abbildung 36 ein Peakmaximum bei  $17,8 \pm 0,1$  min gefunden. Der Peak zeigt eine Schulter zu höheren Retentionszeiten. Die drei PS-Standards mit Retentionszeiten von  $13,9 \pm 0,4$  min,  $21,5 \pm 0,5$  min und  $27,8 \pm 0,3$  min konnten nahezu basisliniengetrennt werden. Es wurde ein exponentieller Zusammenhang zwischen der Größe der drei PS-NP-Standards und ihren Retentionszeiten gefunden. Unter idealen Bedingungen wäre, aufgrund des gradlinig abnehmenden QF, ein linearer Zusammenhang gegeben. Dies bedeutet, dass die PS-Standards nicht ideal eluieren und es zu interpartikulären oder Interaktionen mit der Membran kommen kann, z.B. könnten größere NP von der Membran stärker abgestoßen werden. Da PS und die BAM N-001 NP mit der gewählten Methode ein unterschiedliches Verhalten sowie eine unterschiedlich dicke Hydrathülle zeigen könnten und geeignete NP aus dem gleichen Material und/oder mit der gleichen Oberflächenbeschichtung wie die Probe nicht verfügbar sind, wurde die Größenbestimmung mit PS-Standards lediglich als Größenabschätzung betrachtet. Für die BAM N-001 NP ergab sich demnach ein Durchmesser von  $27,36 \pm 0,20$  nm. Da es sich hier

um den geometrischen Durchmesser handelt und der zertifizierte Wert von  $d_{50} = 18,5 \pm 2,5$  nm (volumengewichtet) dem Streumassenradius, einem durch Streuungsexperimente bestimmten Kernradius ohne Stabilisatoren, entspricht, sind diese nicht notwendigerweise vergleichbar. Der mittels AF4 erhaltene, größere Wert könnte durch das unterschiedliche Verhalten von organischen (PS) und anorganischen Ag-NP im Eluenten und Kanal hervorgerufen sein. [10]

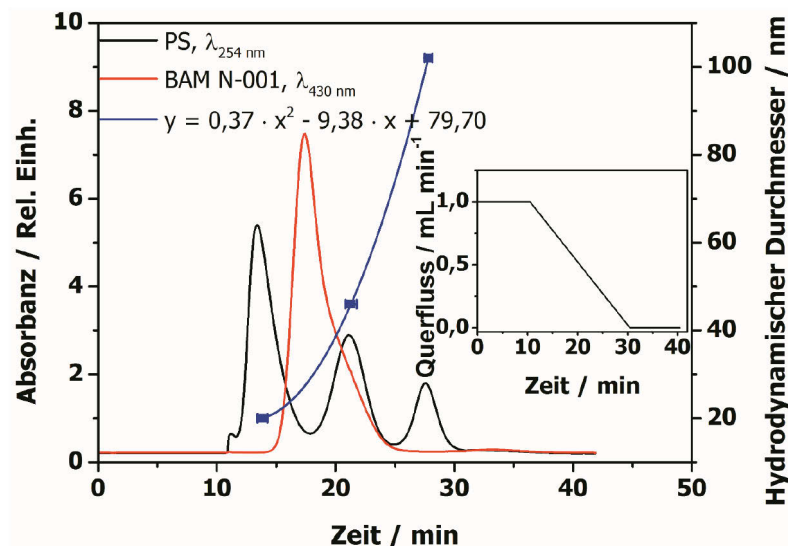


Abbildung 36: Größenkalibrierung (Polynom 2. Grades) der Probe BAM N-001 (rot) mit einer Mischung aus drei PS-NP-Standards (schwarz) (linear abnehmender QF Gradient, FZ 5 min, IV 100  $\mu$ L, STF 0,77 mL min<sup>-1</sup>, Eluent 200 mg L<sup>-1</sup> NaN<sub>3</sub>).

Mittels *on-line* AF4-ICP-MS wurde eine Kalibrierung mit NIST Au-NP-Standards durchgeführt. Das Fraktogramm dieses Gemisches, der Probe BAM N-001, und das dafür verwendete QF Profil sind in Abbildung 37 dargestellt. Die BAM N-001 NP wurden in einer Konzentration von 0,25 mg L<sup>-1</sup> analysiert. Die drei NIST Au-NP zeigen eine deutlich linearere Kalibriergerade, was darauf hindeutet, dass sie sich unter den gewählten Bedingungen annähernd ideal verhalten. Für die BAM N-001 NP wurde ein Peak mit einem ähnlichen Profil wie in Abbildung 36 erhalten. Da für die ersten etwa 44 min ein konstanter Gradient gewählt wurde, ist die Peakschulter in Abbildung 37 jedoch stärker erkennbar. Unter Verwendung der vom Hersteller angegebenen Referenzwerte für den hydrodynamischen Durchmesser der NIST AU-NP (DLS) ergab sich für die BAM N-001 Ag-NP ein hydrodynamischer Durchmesser von 24,51 nm. Dieser Wert stimmt gut mit dem zertifizierten Trägheitsdurchmesser und auch dem mittels PS-Standards bestimmten geometrischen Wert überein. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass es sich hierbei um drei unterschiedliche Durchmesser handelt (geometrisch, hydrodynamisch und den Streudurchmesser). Für den hydrodynamischen Durchmesser wird aufgrund der Hydrathülle der größte Durchmesser erwartet.

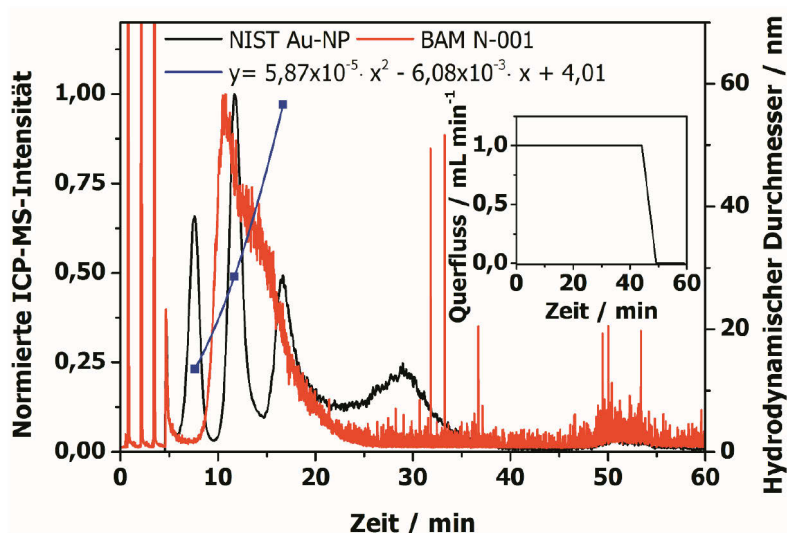


Abbildung 37: Kalibrierung (Polynom 2. Grades) der Probe BAM N-001 (rot) mit einem Gemisch aus drei NIST Au-NP (schwarz) (Quantifizierung mittels FIA zwischen 0-5 min; für 44 min konstanter Gradient; Elutionsstart bei 5 min).

Die zertifizierten Werte mit  $d_{10} = 12,0 \pm 1,9$  nm,  $d_{50} = 18,5 \pm 2,5$  nm und  $d_{90} = 34,6 \pm 4,8$  nm deuten bereits eine Größenverteilung mit einer Peakschulter zu größeren NP-Durchmessern an. Dies kann durch die in Abbildung 36 und 37 dargestellten Fraktogramme der Probe und den DLS-Wert bestätigt werden. Der mittels DLS ermittelte hydrodynamische Durchmesser in Tabelle 6 mit  $49,5 \pm 2,0$  nm resultiert daraus, dass größere NP mehr Licht streuen als kleinere NP und es somit eine Verschiebung zu größeren Durchmessern gibt.

Zusätzlich wurden TSEM-Bilder der Probe aufgenommen, wie in Abbildung 38 beispielhaft gezeigt ist.

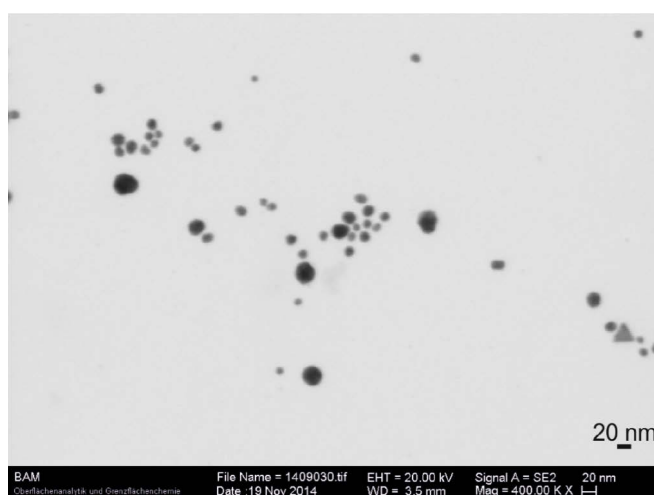


Abbildung 38: TSEM-Abbildung der Probe BAM N-001.

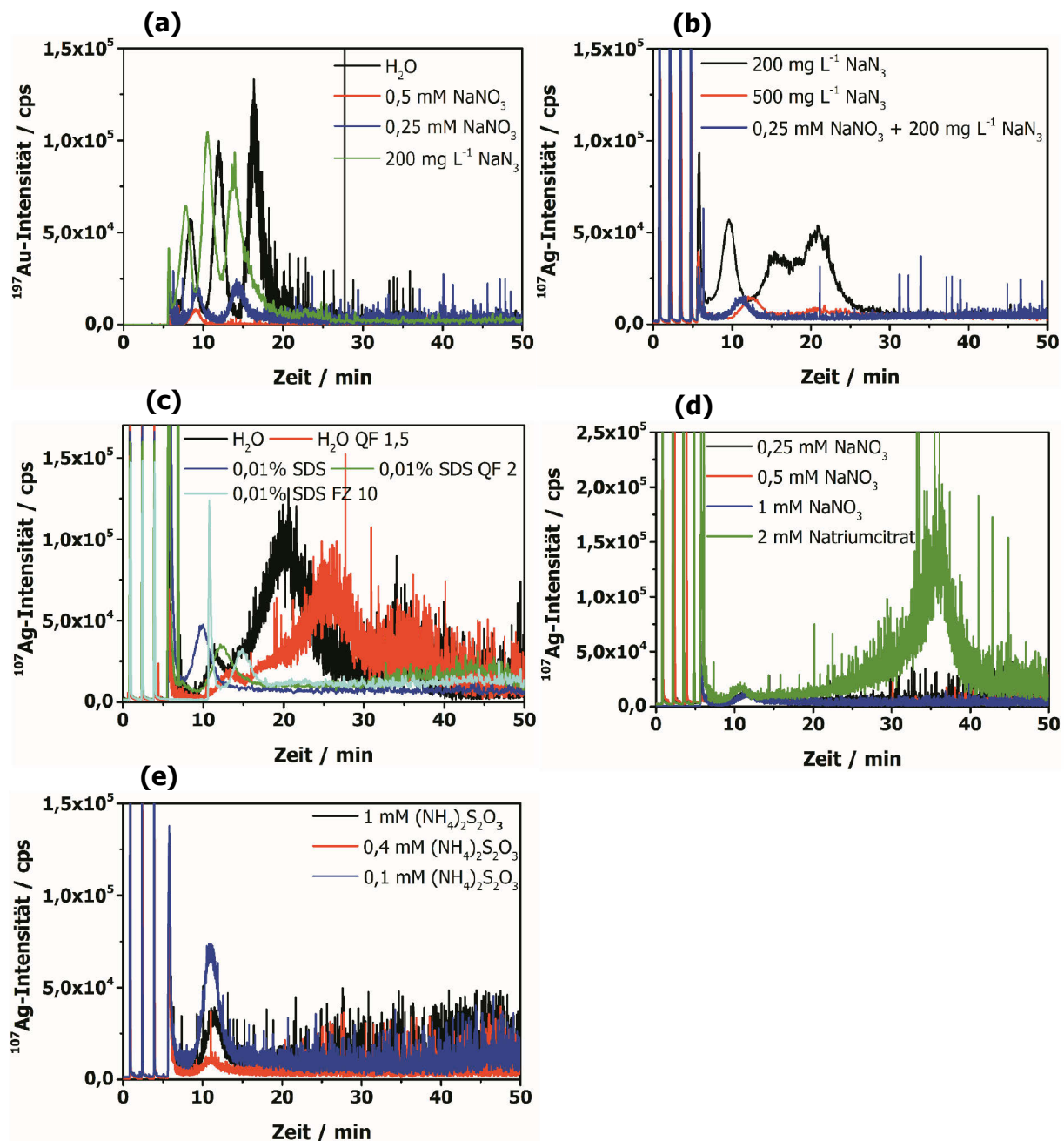
Der mittels TSEM bestimmte Durchmesser (2600 NP) beträgt  $15 \pm 5$  nm. In Abbildung 38 ist ein Ausschnitt aus der Probe BAM N-001 zu sehen. Dort sind neben kleineren auch größere NP



zu erkennen, sodass von einer zumindest bimodalen Verteilung der NP ausgegangen werden kann. [10]

#### 5.4.9 AF4-ICP-MS von Citrat-stabilisierten Ag-NP

Zur Analyse von Citrat-stabilisierten Ag-NP wurde eine erneute Methodenoptimierung durchgeführt. Dazu wurden verschiedene Eluenten mit unterschiedlichen Konzentrationen an  $\text{NaN}_3$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3$ , SDS und Reinstwasser untersucht. In Abbildung 39 a sind die Fraktogramme eines Gemisches der drei NIST Au-NP und Abbildungen 39 b-e die Fraktogramme eines Gemisches aus NC20 und NC60 gezeigt.



Abbildungen 39 a-e: Fraktogramme der NIST Au-NP (a) und der NC20/NC60 NP (b-e) unter Verwendung unterschiedlicher Eluenten.



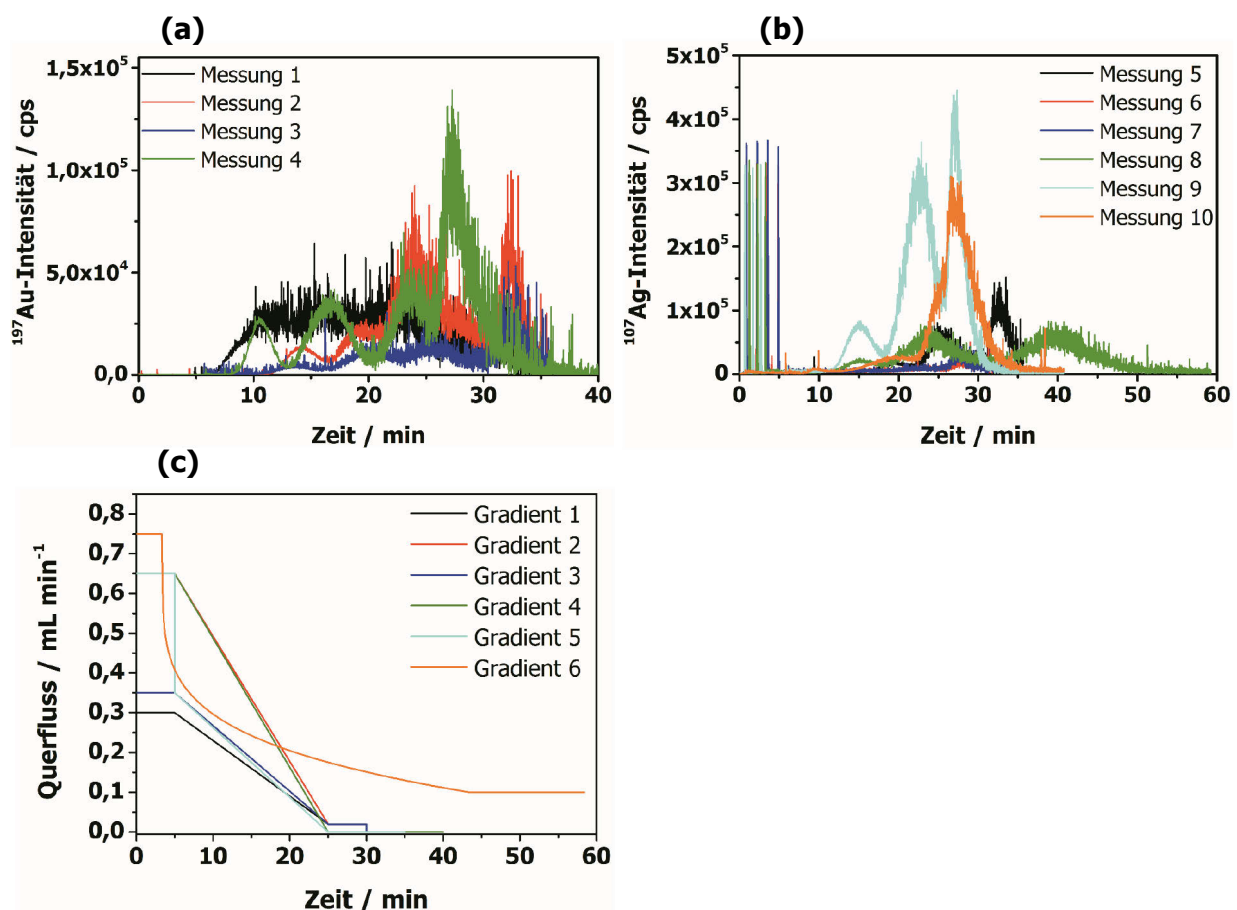
Die Fraktogramme zeigen für die meisten Eluenten neben dem Injektionspeak bei einer Retentionszeit von ca. 5 min nur einen weiteren Peak bei etwa 11 min. Anhand der zuvor erstellen Kalibration kann dieser den NC20 NP zugeordnet werden. Das bedeutet jedoch, dass die NC60 NP nicht eluieren und im AF4-System, möglicherweise auf der Membran, verbleiben. Lediglich die Eluenten  $\text{NaN}_3$  und Reinstwasser zeigen für NC20 und NC60 je einen Peak (siehe Abb. 38 b). Zusätzlich wurden jedoch viele Aggregate/Agglomerate detektiert, die möglicherweise im Verlauf der AF4-Trennung gebildet werden. Für die zur Größenkalibrierung verwendeten Citrat-stabilisierten NIST Au-NP (Abbildung 39 a) wurde ein ähnliches Verhalten gefunden.

## 5.5 Hohlfaser-Fluss-Feldflussfraktionierung-ICP-MS

Aus den zuvor dargestellten Ergebnissen geht hervor, dass die Auflösung und die Elution der Citrat-stabilisierten Ag-NP mittels AF4 häufig nicht ausreichend hoch bzw. vollständig war. Daher wurde untersucht, ob eine Trennung der NC20 und NC60 NP ohne Aggregation mittels HF5 möglich ist. Die HF5 hat eine geringere Membranoberfläche als die des AF4-Kanals und somit weniger Kontaktfläche mit den NP. Zum Vergleich wurden die drei derzeit kommerziell erhältlichen Hohlfasern, 5 kDa und 10 kDa PES (Postnova) und 10 kDa (Wyatt), untersucht und hierfür der Eluent und der QF-Gradient optimiert.

### 5.5.1 Methodenentwicklung

Zur besseren Vergleichbarkeit mit den bisherigen AF4-Trennungen (5 kDa PES-Membran) begann die Untersuchung mit einer 5 kDa Hohlfaser. Dabei wurden unterschiedliche Eluenten und Gradienten verglichen. In Abbildungen 40 a und b sind die Fraktogramme für die drei NIST Au-NP (a) und ein Gemisch aus NC20 und NC60 (b) dargestellt.



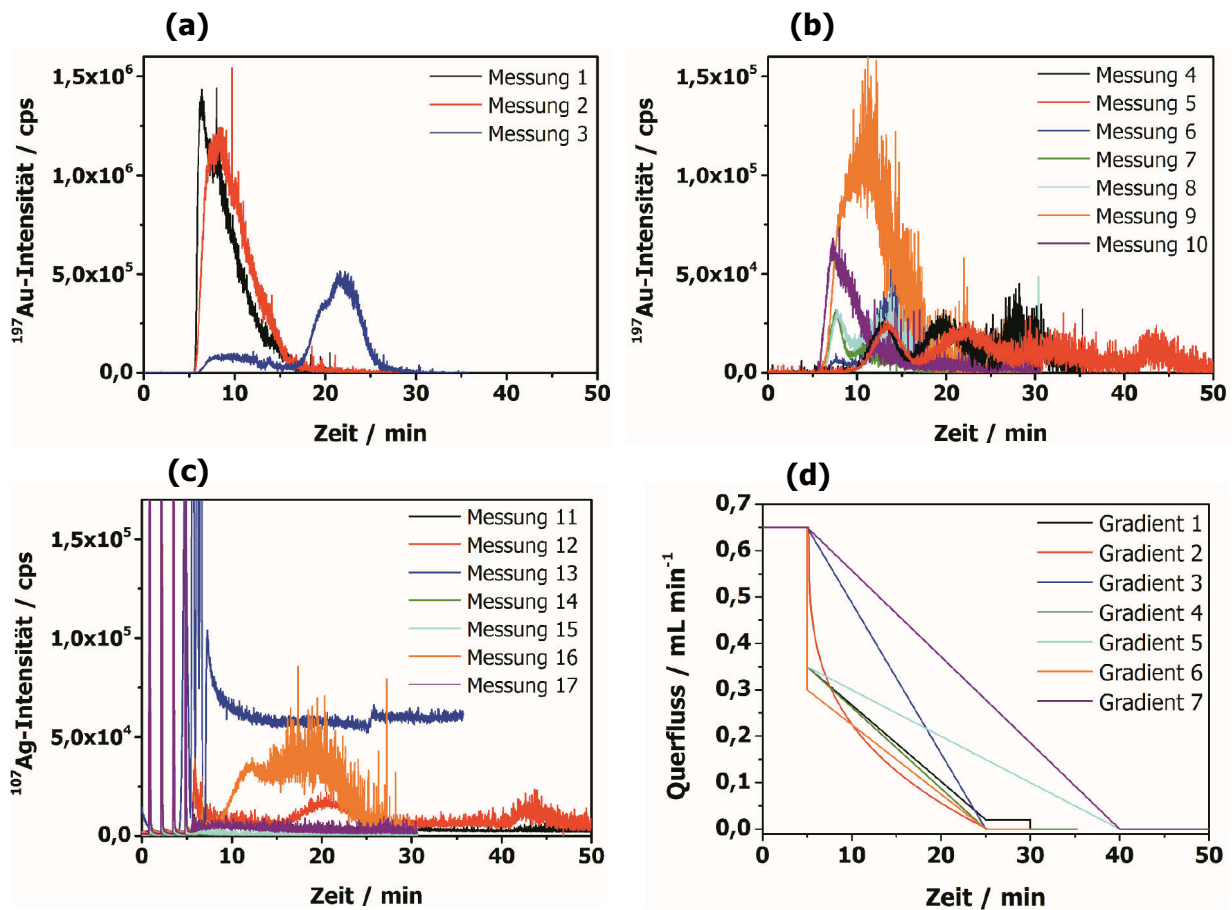
Abbildungen 40 a-c: Fraktogramme der NIST Au-NP, 1:1000 (RM8011), 1:500 (RM8012) und 1:333 (RM8013) (a); des Gemisches aus NC20 (1:100) und NC60 (1:50) (b) sowie die eingesetzten Gradienten (c); 5 kDa PES-HF (Postnova).

Abbildung 40 c illustriert die verwendeten QF-Gradienten, und Tabelle 13 listet die zugehörigen Messparameter auf. In den Fraktogrammen sind für die meisten Messungen nicht die zwei erwarteten Peaks für die NC20 und die NC60 NP erkennbar. So sind beispielsweise in Messung 10 ein großer und ein sehr kleiner Peak erkennbar, während in den Messungen 6 und 7 jeweils nur ein Signal mit sehr geringen Intensitäten sichtbar ist. Überraschenderweise weisen die Fraktogramme 5, 8 und 9 jeweils einen dritten Peak auf, der, nach einem Vergleich der Retentionszeiten mit Abbildung 40 a, von Aggregaten/Agglomeraten stammt.

Tabelle 13: HF5-Parameter für die Fraktogramme in Abbildungen 40 a und b.

Messung	Probe	Eluent	DF / mL min <sup>-1</sup>	FZ / min	Gradient
1	NIST Au-NP	Reinstwasser	0,35	5	1
2	NIST Au-NP	Reinstwasser	0,35	5	2
3	NIST Au-NP	0,25 mM NaNO <sub>3</sub> , 200 mg L <sup>-1</sup> NaN <sub>3</sub>	0,35	5	3
4	NIST Au-NP	0,025% FL-70	0,4	5	4
5	NC20, NC60	Reinstwasser	0,35	5	2
6	NC20, NC60	0,25 mM NaNO <sub>3</sub> , 200 mg L <sup>-1</sup> NaN <sub>3</sub>	0,35	5	5
7	NC20, NC60	0,25 mM NaNO <sub>3</sub> , 200 mg L <sup>-1</sup> NaN <sub>3</sub>	0,35	3	6
8	NC20, NC60	Reinstwasser	0,40	3	6
9	NC20, NC60	0,025% FL-70	0,40	5	4
10	NC20, NC60	1 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> , pH 7,4	0,40	5	4

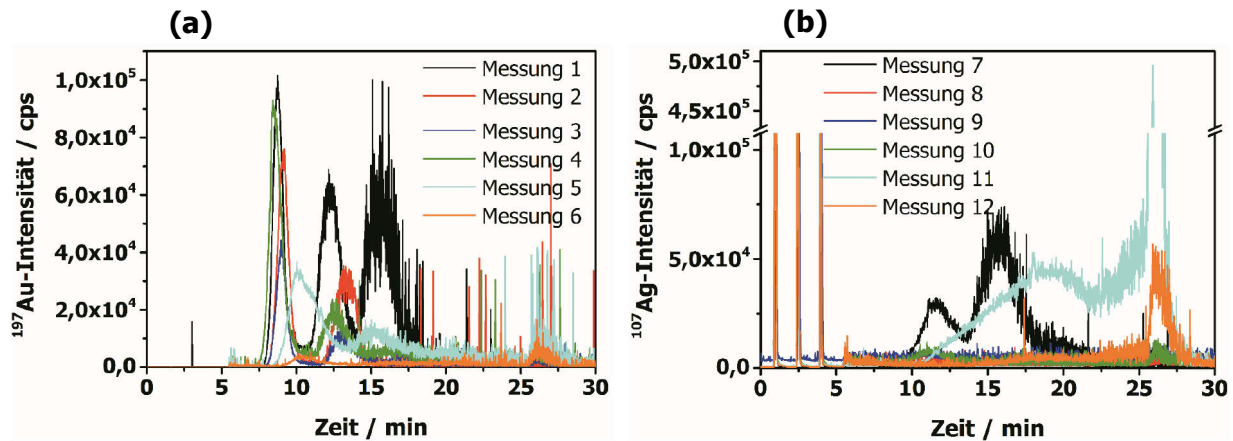
Da es offensichtlich mit dieser Hohlfaser nicht möglich war, NC20 und NC60 NP mit hohen Wiederfindungsraten und ohne Bildung von Aggregaten/Agglomeraten zu trennen, wurde versucht, die Trennbedingungen durch die Verwendung einer 10 kDa PES-HF zu verbessern. In Abbildungen 41 a-c sind die für die drei Au-NP (a) und die NC20 und NC60 NP (b) erhaltenen Fraktogramme sowie die QF-Gradienten (c) zusammengefasst. Tabelle 14 enthält die dazugehörigen Messparameter. Für die Au-NP wurden, wie aus Abbildung 41 a und b ersichtlich ist, lediglich für Messungen 4 und 5 (Eluent NaN<sub>3</sub>) drei Peaks detektiert. In keiner Messung konnte eine Trennung von NC20 und NC60 erzielt werden. Als letztes wurde die 10 kDa PES-HF von Wyatt getestet. Für alle Experimente wurde Gradient 6 aus Abbildung 41 d und Tabelle 14 verwendet. Abbildungen 42 a (NIST Au-NP) und b (NC20 und NC60) illustrieren die Fraktogramme, und Tabelle 15 gibt die verwendeten Eluenten wieder. Für die NIST-Standards und die Ag-NP wurden unter Verwendung des Eluenten Reinstwasser drei bzw. zwei Peaks ohne weitere Aggregate nachgewiesen (siehe Abbildung 42 a und b). Die unter diesen Bedingungen erzielte beste Trennung wurde zur Größenabschätzung und Bestimmung der Wiederfindungsraten sowie für die weiteren Messungen verwendet.



Abbildungen 41 a-d: Fraktogramme der NIST Au-NP (a: RM8011 1:100, RM8012 1:50 und RM8013 1:33 verdünnt; b: RM8011 1:1000, RM8012 1:500 und RM8013 1:333 verdünnt), des Gemisches aus NC20 (1:100) und NC60 (1:50) (c) sowie die eingesetzten Gradienten (d) (IZ 5 min, DF 0,35 mL min<sup>-1</sup>; 10 kDa PES-HF [Postnova]).

Tabelle 14: HF5-Parameter für die Fraktogramme in Abbildungen 41 a-c.

Messung	Probe	Eluent	Gradient
1	NIST Au-NP	Reinstwasser	1
2	NIST Au-NP	Reinstwasser	2
3	NIST Au-NP	Reinstwasser	3
4	NIST Au-NP	200 mg L <sup>-1</sup> NaN <sub>3</sub>	4
5	NIST Au-NP	200 mg L <sup>-1</sup> NaN <sub>3</sub>	5
6	NIST Au-NP	0,25 mM NaNO <sub>3</sub> , 200 mg L <sup>-1</sup> NaN <sub>3</sub>	6
7	NIST Au-NP	2 mM Natriumcitrat	6
8	NIST Au-NP	1 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> , pH 7,4	6
9	NIST Au-NP	0,025% FL-70	6
10	NIST Au-NP	0,01% SDS	6
11	NC20, NC60	200 mg L <sup>-1</sup> NaN <sub>3</sub>	5
12	NC20, NC60	200 mg L <sup>-1</sup> NaN <sub>3</sub>	7
13	NC20, NC60	1 mM NH <sub>4</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	6
14	NC20, NC60	0,25 mM NaNO <sub>3</sub> , 200 mg L <sup>-1</sup> NaN <sub>3</sub>	6
15	NC20, NC60	2 mM Natriumcitrat	6
16	NC20, NC60	0,025% FL-70	6
17	NC20, NC60	0,01% SDS	6



Abbildungen 42 a und b: Fraktogramme der NIST Au-NP, je 1:100 verdünnt (a) sowie des Gemisches aus NC20 (1:100 verdünnt) und NC60 (1:50 verdünnt) (b); 10 kDa PES-HF (Wyatt).

Tabelle 15: Verwendete Suspensionsmittel der Fraktogramme in Abbildungen 42 a und b.

Messung	Probe	Eluent
1	NIST Au-NP	Reinstwasser
2	NIST Au-NP	0,25 mM $\text{NaNO}_3$ , 200 mg $\text{L}^{-1}$ $\text{NaN}_3$
3	NIST Au-NP	2 mM Natriumcitrat
4	NIST Au-NP	0,01% SDS
5	NIST Au-NP	0,025% FL-70
6	NIST Au-NP	200 mg $\text{L}^{-1}$ $\text{NaN}_3$
7	NC20, NC60	Reinstwasser
8	NC20, NC60	0,25 mM $\text{NaNO}_3$ , 200 mg $\text{L}^{-1}$ $\text{NaN}_3$
9	NC20, NC60	2 mM Natriumcitrat
10	NC20, NC60	0,01% SDS
11	NC20, NC60	0,025% FL-70
12	NC20, NC60	200 mg $\text{L}^{-1}$ $\text{NaN}_3$

Für diese Hohl-faser wurden zudem zwei Verdünnungen der NIST Au-NP verglichen. Verdünnung 1 (je 1:1000) wurde in Abbildung 42 a für die Wyatt HF verwendet und Verdünnung 2 (1:1000 (RM8011), 1:500 (RM8012) und 1:333 (RM8013)) für die anderen HF und den AF4-Kanal. In Abbildung 43 sind die Fraktogramme beider Verdünnungen unter Verwendung der optimierten Bedingungen (10 kDa Wyatt HF) gezeigt. Wie in Abbildung 43 erkennbar, wurden gleich hohe Peaks für Verdünnung 1 und deutliche Unterschiede in der Peakhöhe für Verdünnung 2 detektiert. Dieses deutet sowohl für den AF4-Kanal als auch die beiden Postnova HF in Abbildungen 39 a, 40 a und 41 a und b auf einen Größendiskriminierungseffekt hin.

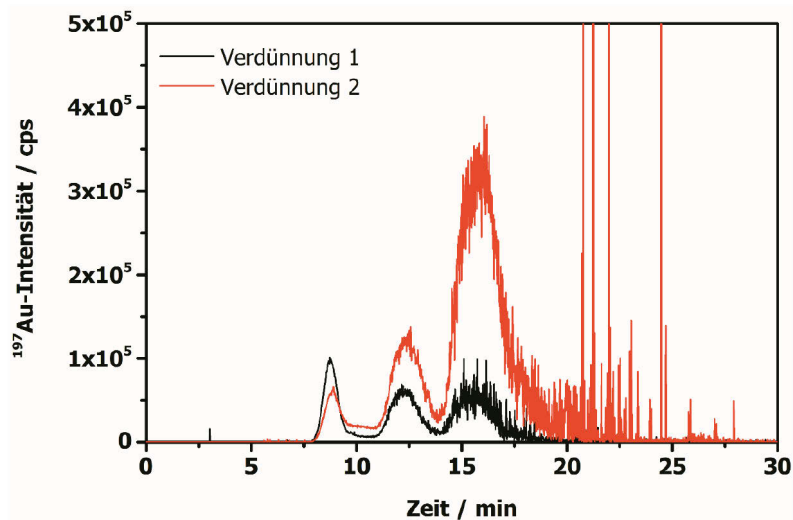


Abbildung 43: Vergleich zweier Verdünnungen der NIST Au-NP.

### 5.5.2 Analytische Güteziffern

Unter den optimierten HF-Bedingungen wurden alle zur Verfügung stehenden Ag-NP-Systeme analysiert. In Abbildung 44 sind die erhaltenen Fraktogramme und in Tabelle 16 die Wiederholbarkeit der Retentionszeiten und die berechneten hydrodynamischen Durchmesser gezeigt.

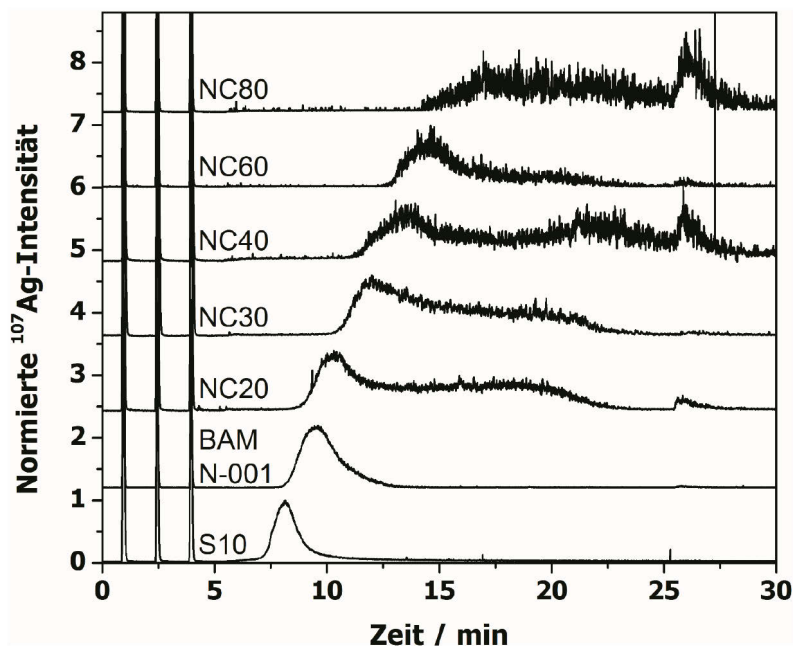


Abbildung 44: Auf das Peakmaximum normierte Fraktogramme der Ag-NP-Systeme; 5-Punkte-Mittelwertglättung; Quantifizierung mittels dreier FIA-Peaks (0-5 min); 10 kDa PES-HF (Wyatt).

Aus Abbildung 44 geht eine gute Auflösung der NP-Systeme hervor. Für die NC30, NC40, NC60 und NC80 NP wurden zusätzlich zum NP-Peak Aggregate- bzw. Agglomerate detektiert.

Tabelle 16: Wiederholbarkeit und berechnete hydrodynamische Durchmesser für die untersuchten Ag-NP-Systeme.

NP	Verdünnung	Retentionszeit / min	Berechneter hydrodynamischer Durchmesser / nm
S10	200	8,15 ± 0,01	13,93 ± 0,07
NC20	100	10,17 ± 0,14	24,6 ± 0,9
NC30	100	11,59 ± 0,13	55,5 ± 1,8
NC40	50	13,12 ± 0,12	51,2 ± 1,3
NC60	100	14,57 ± 0,20	64,1 ± 2,3
NC80	25	16,9 ± 0,4	100 ± 6
BAM N-001	200	9,53 ± 0,23	20,5 ± 1,4

Die erhaltenen Retentionszeiten des Peakmaximums in Abbildung 44 und Tabelle 16 korrelieren gut mit den nominellen Durchmessern der NP. Die Werte in Tabelle 16 weisen zudem auf eine gute Wiederholbarkeit der Messungen hin. Die bestimmten hydrodynamischen Durchmesser steigen, mit Ausnahme der NC30 NP, mit der Retentionszeit. Letztere wurde mit einer HF einer neuen Charge analysiert, für die eine etwas schnellere Elution der NIST Au-NP in der Kalibration erhalten wurde. Diese neue Kalibration resultierte für diese Probe in einem zu großen Durchmesser. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass sich die HF generell nur maximal drei Messtage bzw. ca. 30 Experimente lang verwenden ließen, was eine Routineanwendung wesentlich einschränkt.

In Tabelle 17 sind die ermittelten Konzentrationen, Wiederfindungsraten und die NWG aufgeführt. Da ein stabiles In-Signal während den einzelnen Experimenten detektiert wurde und somit ein konstanter DF vorlag, wurde für die Bestimmung der Konzentrationen und Wiederfindungsraten nicht auf In normiert.

Tabelle 17: Ermittelte Konzentrationen, Wiederfindungsraten und NWG für die untersuchten Ag-NP Systeme.

NP	Verdünnung	Konzentration / mg L <sup>-1</sup>	Wiederfindungsrate / %	NWG / ng L <sup>-1</sup>
S10	200	7,6 ± 0,7	35,0 ± 2,8	83 ± 7
NC20	100	8,6 ± 1,1	423 ± 6	41 ± 16
NC30	100	10,4 ± 0,5	46,1 ± 1,8	62 ± 10
NC40	50	5,3 ± 1,3	25 ± 7	78 ± 20
NC60	100	8,1 ± 0,6	28,1 ± 1,9	64 ± 27
NC80	25	3,8 ± 0,5	12,7 ± 1,7	205 ± 66
BAM N-001	200	44 ± 4	72,8 ± 1,0	48 ± 4

Aus Tabelle 17 lässt sich erkennen, dass die Wiederfindungsraten mit steigender Größe leicht sinken. So wurde die niedrigste Wiederfindungsrate mit  $12,7 \pm 1,7\%$  für die NC80 NP gefunden. Diese könnten durch eine unzureichende Stabilisierung und eine zu geringe Abstoßung auf der Membran verbleiben. Die höchste Wiederfindungsrate von  $72,8 \pm 1,0\%$  wurde für die Tween 20 und Tagat TO beschichteten BAM N-001 bestimmt.

Unter der Verwendung einer HF wird angenommen, dass  $\text{Ag}^+$ -Ionen die Poren der Membran ebenfalls passieren können. Für die Citrat-stabilisierten Ag-NP fehlt bisher eine Angabe zum Gehalt an  $\text{Ag}^+$ -Ionen. Mittels Ultrafiltration wurden Werte von unter  $0,1\%$  gefunden, welche die geringen Wiederfindungsraten in Tabelle 17 nicht erklären können. Die  $\text{Ag}^+$ -Ionen dieser NP könnten hierbei an der Ultrafiltrationsmembran oder der Solvathülle der NP selbst verbleiben. Um dieses zu überprüfen, wurde der QF der HF aufgefangen. Dabei wurden für Dreifachmessungen jedoch relative Standardabweichungen von bis zu  $85\%$  für die einzelnen NP erhalten. Der  $\text{Ag}^+$ -Ionen-Anteil für das BAM N-001 lag mit dieser Methode bei  $4,2 \pm 2,1\%$  und somit deutlich unter dem mittels Ultrafiltration ermittelten Wert von  $7,87 \pm 0,10\%$  aus Kapitel 5.4.6. Dieses könnte an einem Verbleib der Ionen in den PEEK-Kapillaren oder an der Membran liegen. Daher sollen als weiteres Verfahren zur Bestimmung des Gehaltes an  $\text{Ag}^+$ -Ionen die EP-ICP-MS in Kapitel 5.6.4 und die HPLC in Kapitel 5.7 untersucht werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit optimierte HF-Methode ist in der Lage, die untersuchten NP mit einer guten Auflösung und in einer – für eine FFF-Methode – kurzen Analysenzeit von 30 min zu trennen. Allerdings wurden weiterhin Aggregate detektiert und Wiederfindungsraten von  $< 46\%$  gefunden. Somit eignet sich diese FFF-Methode nicht für eine zuverlässige Konzentrationsbestimmung.



## 5.6 Einzelpartikel-ICP-MS

Aufgrund der zuvor dargestellten Schwierigkeiten hinsichtlich der Wiederfindungsraten sollte eine exakte Bestimmung der Partikelanzahl und deren Größenverteilung mittels EP-ICP-MS untersucht werden. Dafür wurden die Probenvorbereitung, die Transporteffizienz, die Probenkonzentration und die Integrationszeit optimiert. Zur Analyse von Ag-NP in komplexen Proben wurde die IVA mit der EP-ICP-MS kombiniert.

### 5.6.1 Optimierung der Probenvorbereitung

Zunächst wurde die Probenvorbereitung optimiert. Als Ausgangsbedingungen wurden die Abfall-Auffang-Methode zur Bestimmung der Transporteffizienz, eine Partikelkonzentration zwischen  $4,6 \times 10^6 \text{ NP L}^{-1}$  und  $1,3 \times 10^7 \text{ NP L}^{-1}$  und eine Integrationszeit von 10 ms verwendet. Es wurden drei unterschiedliche Suspensionsmittel (Reinstwasser, 2 mM Natriumcitrat und 2 mM Ammoniumcitrat) zur Probenverdünnung getestet (siehe auch experimenteller Teil, Kapitel 4.4.9). Aus der externen Kalibration ergaben sich Kalibrierfaktoren von  $105860 \text{ cps } \mu\text{g}^{-1}$ ,  $53942 \text{ cps } \mu\text{g}^{-1}$  und  $99928 \text{ cps } \mu\text{g}^{-1}$  Ag (siehe Gleichung 32, Kapitel 3.5.4). Als Proben wurden NC40, NC60 (je 1:2.500.000) und NC80 (1:500.000) verwendet. In Abbildungen 45 a und b sind beispielhaft die erhaltenen, zeitaufgelösten Signalintensitäten für einen 50 s langen Abschnitt (a) und das daraus erhaltene Histogramm (b) für die Probe NC60 unter Verwendung des Suspensionsmittels Reinstwasser dargestellt.

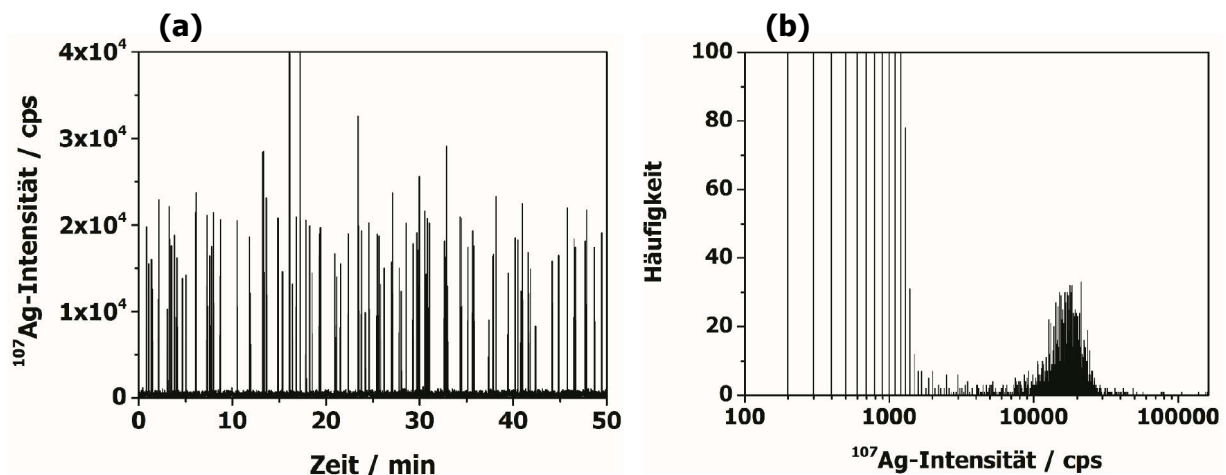
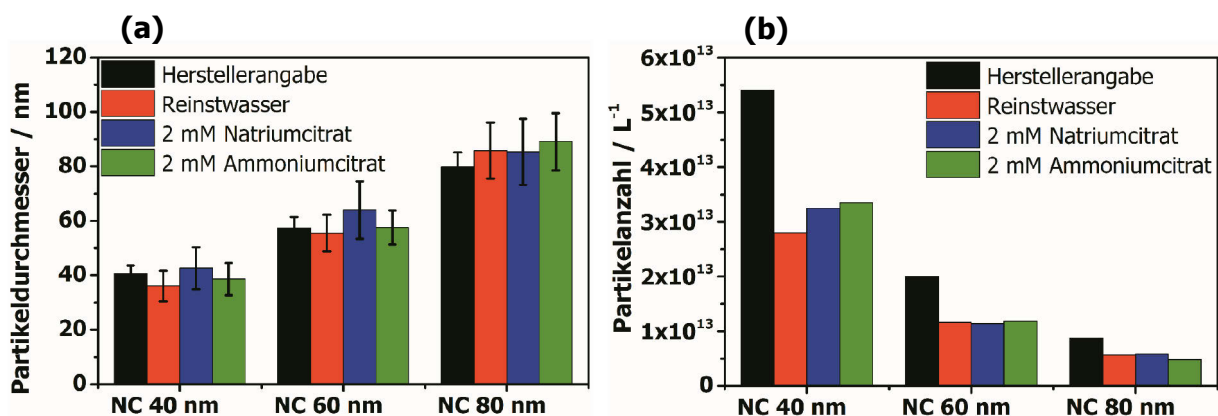


Abbildung 45 a und b: Zeitaufgelöste Signalintensitäten und daraus resultierendes Histogramm beispielhaft für die Probe NC60 1:2.500.000 in Reinstwasser verdünnt.

Aus Abbildung 45 a sind wenige Signale mit doppelter Intensität zu erkennen. Aus dem Histogramm ist eine klare Abtrennung von Untergrundsignalen (unter ca. 1100 cps) und NP (ab ca. 7000 cps) zu erkennen. Um aus den erhaltenen Intensitäten die Partikelmassen zu berechnen, wurde eine von Peters *et al.* [133] entwickelte Auswertungsdatei für EP-ICP-MS-

Experimente verwendet. Basierend auf dieser Datei wird zunächst visuell aus dem Histogramm der Signalintensitäten (siehe Abbildungen 45 b) ein Grenzwert festgelegt, welcher die Signale in Untergrund- und Partikelsignal sortiert. Der Untergrundwert entspricht hierbei den  $\text{Ag}^+$ -Ionen. Aus den einzelnen Signalen wird anschließend die Masse pro Partikel und, unter der Annahme sphärischer Partikel, der Durchmesser berechnet. In Abbildung 46 a und b sind die aus den Signalen berechneten Partikeldurchmesser (a) und die berechnete Partikelanzahl (b) für die drei Eluenten und die drei Proben NC40, NC60 und NC80 dargestellt. Die ersichtlichen Partikeldurchmesser stimmen gut mit den Herstellerangaben überein. Im Gegensatz dazu liegen die gefundenen Partikelanzahlen teilweise deutlich unter den Angaben vom Hersteller. Dieses könnte zum einen an der Methode zur Bestimmung der Transporteffizienz (Abfluss-Auffang-Methode) liegen, die Verluste in der Zerstäuber- und Auffangkammer vernachlässigt. Weiterhin könnte eine unzureichende Stabilisierung zum Verbleib von NP in Probengefäßen und den Transportschläuchen führen.



Abbildungen 46 a und b: Ermittelte Partikeldurchmesser (a) und Partikelanzahl (b) von NC40, NC60 und NC80 in verschiedenen Suspensionsmitteln (Integrationszeit 10 ms).

Da keine signifikanten Unterschiede unter Verwendung der drei verschiedenen Verdünnungsmittel nachweisbar waren, wurde Reinstwasser, das den höchsten Kalibrierfaktor hatte und damit die höchste Empfindlichkeit zeigte, verwendet.

### 5.6.2 Optimierung der Transporteffizienz

Drei unterschiedliche, von Pace *et al.* [79] beschriebene, Ansätze zur Bestimmung der Transporteffizienz wurden anhand der NP NC40, NC60 und NC80 miteinander verglichen. Die Abfluss-Auffang-Methode resultierte in einer Transporteffizienz von  $10,2 \pm 0,5\%$ . Der berechnete Wert über die Partikelgröße (TEM, Herstellerangabe) für die drei NP lag bei  $9,1\%$ . Über die Partikelanzahl ergaben sich Transporteffizienzen von  $5,2\%$  (NC40),  $5,8\%$  (NC60) und  $6,5\%$  (NC80). Die Werte basierten hierbei auf den Herstellerangaben und der Verwendung einer Integrationszeit von 10 ms.

Da die Abfluss-Auffang-Methode, wie zuvor erwähnt, mögliche Verluste in der Zerstäuberkammer nicht berücksichtigt, wurde hierfür die höchste Transporteffizienz erhalten. Der über die Partikelanzahl ermittelte Wert ist am geringsten, was darauf zurückzuführen ist, dass möglicherweise NP an der Gefäßwand haften bleiben oder aggregieren. Dieses Verhalten wurde für alle drei untersuchten NP-Systeme beobachtet. Daher wurde mit dieser Methode weitergearbeitet.

### 5.6.3 Optimierung der Partikelkonzentration

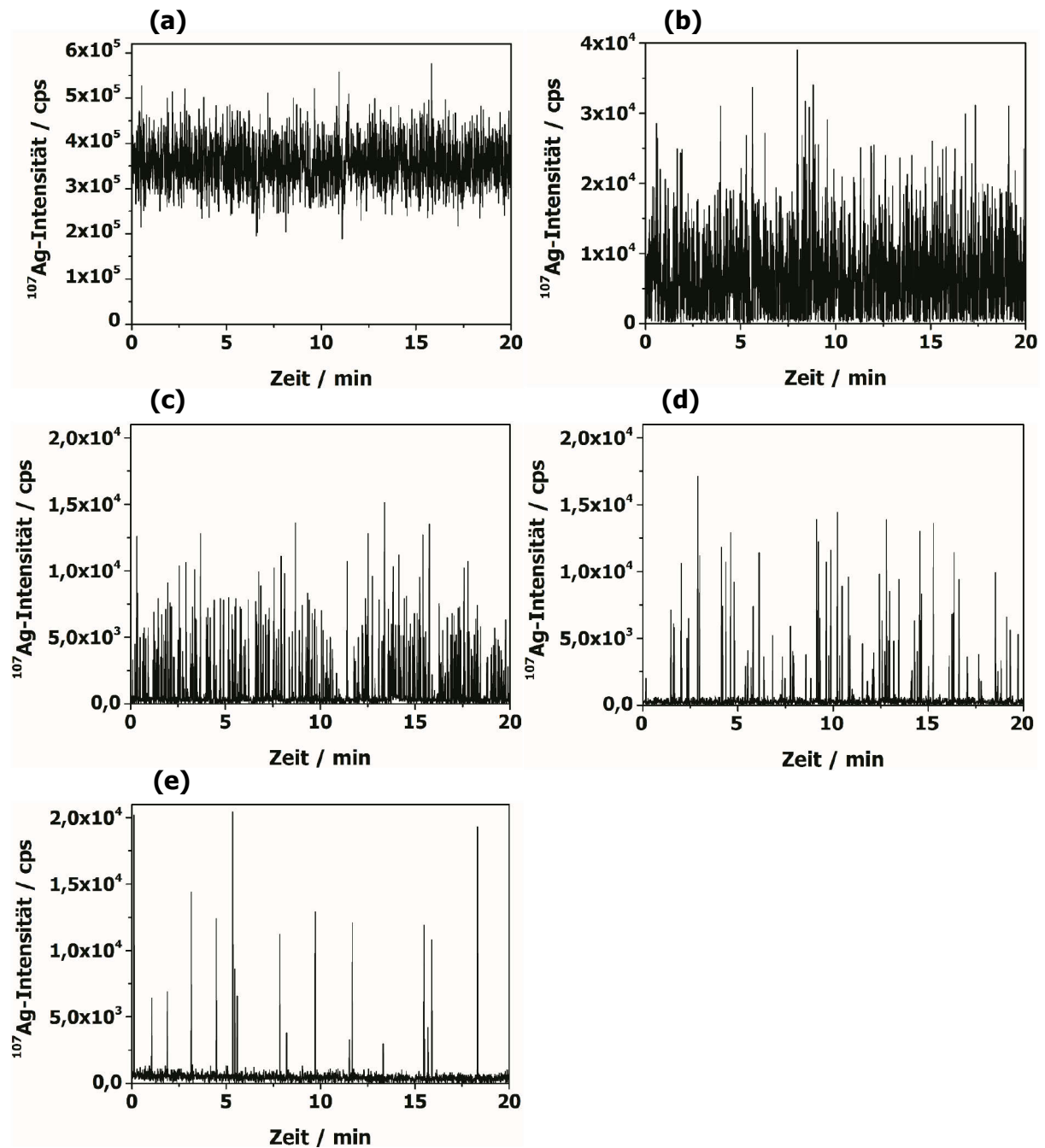
Die Konzentration an Partikeln spielt in der EP-ICP-MS eine wichtige Rolle. Eine zu hohe Konzentration kann zur unerwünschten simultanen Detektion mehrerer NP innerhalb der ausgewählten Integrationszeit führen. Eine zu geringe Konzentration hingegen erfordert lange Analysenzeiten, um die angestrebten ca. 1000 NP-Signale pro Experiment aufzuzeichnen.

Anhand von BBI40 Ag-NP wurden verschiedene Ag-Konzentrationen im EP-Modus analysiert. In Abbildungen 47 a-e sind die zeitaufgelösten Signalintensitäten für verschiedene Partikelkonzentrationen dargestellt. Aus diesen geht hervor, dass lediglich für Partikelkonzentrationen zwischen  $1,8 \times 10^6 \text{ NP L}^{-1}$  und  $1,8 \times 10^7 \text{ NP L}^{-1}$  einzelne NP in den zeitaufgelösten Signalen erkennbar sind. Höhere Konzentrationen ergeben ein kontinuierliches (a) oder viele Signale mit doppelter Intensität (b). Zur Vermeidung sehr langer Analysezeiten (siehe Abbildung 47 e,  $69 \text{ NP min}^{-1}$ ) wurden die weiteren Experimente mit Partikelkonzentrationen zwischen  $3,6 \times 10^6 \text{ Partikel L}^{-1}$  (c,  $187 \text{ NP min}^{-1}$ ) und  $1,8 \times 10^7 \text{ Partikel L}^{-1}$  (d,  $769 \text{ NP min}^{-1}$ ) durchgeführt.

### 5.6.4 Optimierung der Integrationszeit

Das Ziel der EP-ICP-MS ist die Detektion möglichst weniger NP-Signale mit halber bzw. doppelter Intensität (siehe Abb. 14, theoretischer Teil) bei kurzen Analysenzeiten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher der Einfluss der Integrationszeit auf die gefundene Partikelanzahl, -größe und Transporteffizienz untersucht. Hierfür wurden Integrationszeiten von 0 ms, 0,1 ms, 1 ms, 3 ms, 5 ms und 10 ms zur Untersuchung der NIST Au-NP (30 nm und 60 nm) verwendet. Dabei wurde je ein NP-System als Probe betrachtet, während das andere als Transporteffizient-Standard diente. Die Analysenzeiten für alle weiteren Experimente betrugen 0,6 min bei einer Integrationszeit von 0,1 ms und 10 min bei 1-10 ms. Für die Untersuchungen wurden die NP stark verdünnt ( $1:12.500.000$  [30 nm NP] bzw.  $1:2.500.000$  [60 nm NP] bei 1 min, 3 min, 5 min, 10 min und  $1:500.000$  [30 nm] bzw.  $1:100.000$  [60 nm] bei 100  $\mu\text{s}$ ). Die erhaltenen Partikeldurchmesser (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, Median in Klammern), Partikelanzahlen, Au-Massen, Transporteffizienzen und NWG bei unterschiedlichen Integrationszeiten sind für die 30 nm und die 60 nm Au-NP in Tabellen 18 (30 nm) und 19 (60 nm) aufgeführt.



Abbildungen 47 a-e: Analyse der Probe BBI40 mittels EP-ICP-MS unter Verwendung der Partikelkonzentrationen von  $9,0 \times 10^9 \text{ NP L}^{-1}$  (a),  $1,8 \times 10^8 \text{ NP L}^{-1}$  (b),  $1,8 \times 10^7 \text{ NP L}^{-1}$  (c),  $3,6 \times 10^6 \text{ NP L}^{-1}$  (d) und  $1,8 \times 10^6 \text{ NP L}^{-1}$  (e). Die Integrationszeit betrug 10 ms.

Aus den Tabellen 18 und 19 geht hervor, dass die Partikelgröße, Au-Konzentration und NWG bei kürzerer Integrationszeit kleiner werden. Gleichzeitig steigt die Anzahl der detektierten NP an. Diese deutet auf eine vermehrte Detektion NP-Signale mit halber Intensität hin (siehe Abbildung 15, Kapitel 3.5.4). Um dieses zu vermeiden, wurden die folgenden Analysen bei einer Integrationszeit von 10 ms durchgeführt.

Tabelle 18: Einfluss der Integrationszeit auf die Transporteffizienz, Partikelanzahl, -größe (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, Median in Klammern), Au-Konzentration und NWG für die NIST30 Au-NP.

Integrationszeit / ms	Transporteffizienz / %	Anzahl detektierter Partikel	Partikelanzahl / L <sup>-1</sup>	Au-Konzentration / mg L <sup>-1</sup>	Partikeldurchmesser / nm	NWG d <sub>H</sub> / nm
10	4,6	2785	1,7x10 <sup>14</sup>	52,45	31 $\pm$ 5 (31)	9,9
5	4,7	2717	1,5 x10 <sup>14</sup>	39,65	29 $\pm$ 4 (29)	11,1
3	3,8	2113	2,3x10 <sup>13</sup>	12,92	37 $\pm$ 7 (36)	11,5
1	4,41	2113	1,7x10 <sup>13</sup>	2,69	24 $\pm$ 4 (24)	7,5
0,1	1,34	1205	3,1x10 <sup>13</sup>	0,30	24 $\pm$ 6 (23)	5,9

Tabelle 19: Einfluss der Integrationszeit auf die Transporteffizienz, Partikelanzahl, -größe (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, Median in Klammern), Au-Konzentration und NWG für die NIST60 Au-NP.

Integrationszeit / ms	Transporteffizienz / %	Anzahl detektierter Partikel	Partikelanzahl / L <sup>-1</sup>	Au-Konzentration / mg L <sup>-1</sup>	Partikeldurchmesser / nm	NWG d <sub>H</sub> / nm
10	6,0	2311	3,8x10 <sup>13</sup>	75,18	58 $\pm$ 7 (57)	19,8
5	6,7	2353	3,7x10 <sup>13</sup>	58,46	54 $\pm$ 5 (54)	20,1
3	7,0	2567	5,1x10 <sup>13</sup>	58,78	48 $\pm$ 6 (49)	15,4
1	9,4	3327	5,6x10 <sup>13</sup>	58,69	45 $\pm$ 10 (46)	13,0
0,1	2,0	1123	4,3x10 <sup>13</sup>	2,47	44 $\pm$ 11 (43)	29,7

Tabelle 20 gibt die erhaltenen Partikeldurchmesser, NWG, Partikelanzahlen, die Ag-Konzentration der NP, den Gehalt an Ionen und die Gesamtwiederfindungsrate an Ag für die untersuchten Ag-NP-Systeme wieder.

Tabelle 20: Berechnete Partikeldurchmesser (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, Median in Klammern), NWG, Partikelanzahlen, Ag-Konzentration der NP, Gehalt an Ag<sup>+</sup>-Ionen und Gesamtwiederfindungsrate an Ag (bezogen auf die Konzentrationen aus Tabelle 4, Kapitel 5.2) für die untersuchten Ag-NP-Systeme.

NP	Partikeldurchmesser / nm	NWG d <sub>H</sub> / nm	Partikelanzahl	Ag-Konzentration (NP) / mg L <sup>-1</sup>	Gehalt an Ag <sup>+</sup> -Ionen / %	Gesamtwiederfindung / %
NC20	19 $\pm$ 5 (18)	7,2	2,6x10 <sup>14</sup>	10,74	12,0	65,2
NC30	24 $\pm$ 5 (24)	10,6	1,1x10 <sup>14</sup>	9,16	6,0	46,5
NC40	40 $\pm$ 7 (40)	12,1	2,6x10 <sup>13</sup>	9,57	6,2	52,3
NC60	55 $\pm$ 6 (55)	19,1	1,2x10 <sup>13</sup>	10,87	4,1	41,2
NC80	77 $\pm$ 12 (75)	27,4	7,1x10 <sup>12</sup>	18,65	4,9	68,0

Aus Tabelle 20 ist erkennbar, dass die Gesamtwiederfindungsraten für die Ag-NP und die Ag<sup>+</sup>-Ionen zwischen ca. 41-68% lagen. Sie sind damit höher als mittels HF5 (siehe Tabelle 17). Verluste könnten an den Gefäßwänden durch die hohe Verdünnung oder durch Aggregation aufgrund unzureichender Stabilisierung auftreten. Die ermittelten geometrischen Durchmesser liegen innerhalb der Standardabweichung der Herstellerangabe (TEM, siehe Kapitel 4.2). Ein Vorteil dieser Methode liegt in der Bestimmung des Gehaltes an Ag<sup>+</sup>-Ionen.

Die entsprechenden normierten Anzahlverteilungen der Partikelgrößen sind in Abbildung 48 dargestellt.

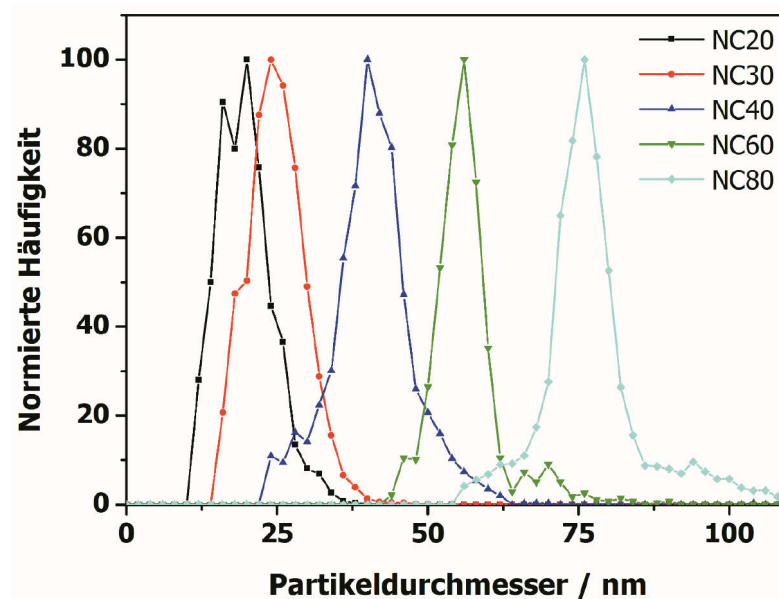


Abbildung 48: Normierte Anzahlverteilung der Partikelgrößen der untersuchten Ag-NP-Systeme.

Für die verschiedenen Proben konnten in Abbildung 48 deutliche Unterschiede in den Anzahlverteilungen der Partikelgrößen gefunden werden. Dabei wurden selbst für die größeren NP nur wenige Signale mit halber bzw. doppelter Intensität detektiert (siehe Abbildung 15, Kapitel 3.5.4).

### 5.6.5 Isotopenverdünnungsanalyse in Kombination mit der Einzelpartikel-ICP-MS

Mit der EP-ICP-MS-Methode konnten die Größe, die Partikelanzahl und die Ag-Konzentration der untersuchten Ag-NP-Systeme erfolgreich analysiert werden. Jedoch können durch die Verwendung der externen Kalibrierung Matrixeffekte, die in der Analyse komplexer und/oder unbekannter Proben eventuell auftreten, nicht ausgeglichen werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher die Kombination der EP-ICP-MS und der IVA untersucht werden.

Ein Q-MS kann Isotope nur abwechselnd messen und ist somit nicht in der Lage, beide Ag-Isotope simultan zu detektieren. Wie in Tabellen 18 und 19 bereits gezeigt, kann das hier verwendete Thermo iCAP Q mit einer minimalen Integrationszeit von 100 µs betrieben werden. In der konventionellen EP-ICP-MS würde dieses zu einem NP-Peak mit ca. 3-5 Punkten führen.

Beim Wechsel zwischen zwei Isotopen (z.B.  $^{107}\text{Ag}/^{109}\text{Ag}$ ) entspricht dies lediglich 2-3 Punkten. Dies könnte zur Messung von unvollständiger NP-Signalen und somit zu geringer Partikelmassen führen. Diese Herausforderungen können durch ein Q-MS mit kürzeren Integrationszeiten, welches mehrere Isotope im EP-Modus messen kann [163], oder einen Flugzeit-Massenanalysator (TOF), welcher mehrere Isotope parallel detektieren kann, überwunden werden. Letzterer ist jedoch oftmals zu unempfindlich für die Detektion kleinerer NP. [164, 165] Da diese Geräte nicht zur Verfügung standen, sollte die Eignung eines regulären ICP-Q-MS mit typischen EP-ICP-MS-Messbedingungen zur sequentiellen Detektion von zwei Isotopen des gleichen Elementes untersucht werden.

Zur Analyse von Ag-NP können, aufgrund des bekannten, natürlichen Isotopenverhältnisses (und der bestimmten Massendiskriminierung), dabei prinzipiell beide Isotope verwendet werden. Hierbei kann es jedoch zur vermehrten Aufzeichnung von unvollständigen NP-Signalen kommen. [166] Für den Massenwechsel benötigt das ICP-MS zudem eine kurze Stabilisierungszeit. Für das hier verwendete Thermo iCAP Q beträgt dieser 1,38 ms für den Sprung von der Masse 107 auf 109 und 0,67 ms für den Sprung zurück. Die Verwendung von kürzeren Integrationszeiten ( $\leq 5$  ms) für die beiden Isotope würde somit zu einem Verlust von mindestens 17% der NP führen. Daher wurde entschieden, die in Kapitel 5.6.4 bereits optimierte Integrationszeit von 10 ms zu verwenden. Diese resultiert in einem Messzyklus von 22 ms mit einem Verlust von etwa 9%.

Ein Fokus dieser Arbeit lag auf der Entwicklung universeller Methoden zur Analyse von Ag-NP unabhängig von Oberflächenbeschichtung, Gehalt an Ionen und Matrix. Da es für unbekannte Proben oftmals nicht möglich ist, eine Matrix-angepasste Kalibrierung durchzuführen, kann ein interner Standard, z.B. ein IVA-Standard, zur Kompensation verwendet werden. Mangels geeigneter, isotopenangereicherter Ag-NP-Standards wird hier die speziesunspezifische IVA verwendet, die bereits von Telgmann *et al.* [167] vorgeschlagen wurde. In der Auswertung mittels der in Kapitel 3.6.3 aufgeführten Gleichungen muss, da mit einem Q-MS beide natürlichen Isotope,  $I(^{107}\text{Ag}_{\text{nat, NP}})$  und  $I(^{109}\text{Ag}_{\text{nat, NP}})$ , nicht zum exakt gleichen Zeitpunkt detektiert werden können, eine Vereinfachung des Isotopenverhältnisses  $R\left(\frac{^{109}\text{Ag}}{^{107}\text{Ag}}\right)$  angewandt werden. Dadurch ergibt sich Gleichung 45:

$$R\left(\frac{^{109}\text{Ag}}{^{107}\text{Ag}}\right) = \frac{I(^{109}\text{Ag})}{I(^{107}\text{Ag})} = \frac{I(^{109}\text{Ag}_{\text{IVA}}) + I(^{109}\text{Ag}_{\text{nat, NP}})}{I(^{107}\text{Ag}_{\text{IVA}}) + I(^{107}\text{Ag}_{\text{nat, NP}})} \quad (45)$$

mit  $I(^{109}\text{Ag}_{\text{IVA}})$  und  $I(^{107}\text{Ag}_{\text{IVA}})$ , den Intensitäten der Isotope des zugegebenen IVA-Standards.

Setzt man voraus, dass die Intensität des Isotopes  $^{109}\text{Ag}_{\text{IVA}}$  des IVA-Standards deutlich über der Intensität des  $^{109}\text{Ag}_{\text{nat, NP}}$  des NP mit dem natürlichen Isotopenverhältnis (nat) liegt, kann Gleichung 45 zu Gleichung 46 vereinfacht werden.

$$R\left(\frac{^{109}\text{Ag}}{^{107}\text{Ag}}\right) = \frac{I(^{109}\text{Ag}_{\text{IVA}})}{I(^{107}\text{Ag}_{\text{IVA}}) + I(^{107}\text{Ag}_{\text{nat, NP}})} \quad (46)$$

Unter der Bedingung, dass für  $^{109}\text{Ag}_{\text{IVA}}$  ein nahezu konstantes Signal angenommen werden kann, ermöglicht Gleichung 46 die Bestimmung des Isotopenverhältnisses  $R\left(\frac{^{109}\text{Ag}}{^{107}\text{Ag}}\right)$  mit einem Q-MS.

Im nächsten Schritt kann der Massenfluss  $\text{Mf}_p$  der Probe mittels der bekannten Massenfluss-Gleichung mit der Ergänzung durch die Transporteffizienz  $\eta_n$  berechnet werden. [134]

$$\text{Mf}_p(t) = \eta_n \cdot \text{Mf}_{\text{IS}} \cdot \frac{h_{\text{IS}}^{109} \cdot R(t) \cdot h_{\text{IS}}^{107}}{h_p^{107} \cdot R(t) \cdot h_p^{109}} \quad (47)$$

#### 5.6.5.1 *Anwendung der Isotopenverdünnungsanalyse-Einzelpartikel-ICP-MS*

Basierend auf den zuvor diskutierten theoretischen Grundlagen wurden verdünnte Ag-NP-Suspensionen mit verschiedenen NP-Durchmessern und unter Zugabe eines  $^{109}\text{Ag}$ -IVA-Standards per ICP-MS untersucht. Die Konzentration des IVA-Standards wurde mittels umgekehrter IVA bestimmt und betrug  $9,53 \pm 0,05 \text{ mg L}^{-1}$ . In Abbildungen 49 a-c sind beispielhaft die zeitaufgelösten Signale der Isotope  $^{107}\text{Ag}$  und  $^{109}\text{Ag}$  (a), des  $^{107}\text{Ag}$  Isotops im Detail (b) und des Histogramms (c) der Probe NC40 gezeigt.

Für das angereicherte  $^{109}\text{Ag}$ -Signal in Abbildung 49 a wurde eine mittlere Intensität von etwa 320.000 cps detektiert. Auf dieser Spur ließ sich zwar ein Rauschen, jedoch keine einzelnen NP detektieren. Diese können nur auf dem  $^{107}\text{Ag}$ -Isotop gemessen werden, wie aus Abbildung 49 b hervorgeht. Der leicht erhöhte Untergrund von ca. 8000 cps lässt sich auf den geringen Anteil an  $^{107}\text{Ag}$  in dem isotonenangereicherten  $^{109}\text{Ag}$ -Standard von 1,77% zurückführen. In der Detektion dieser beiden Isotope und des benötigten Massensprunges konnten maximal 45% der NP-Signale auf dem  $^{107}\text{Ag}$ -Isotop gemessen werden. Daher wurden lange Analysenzeiten von 10 min gewählt, um mindestens 1000 NP zu detektieren. Das Histogramm der Signalintensitäten in Abbildung 49 c zeigt eine klare Trennung der NP-Signale vom Untergrund (unter ca. 13.500 cps).

Zum Vergleich ist in Abbildung 50 ein Histogramm einer konventionellen EP-ICP-MS-Analyse gezeigt. Aus diesem ist eine gute Auflösung des NP- und Untergrundsignals zu erkennbar. Der Untergrund besteht hauptsächlich aus den  $\text{Ag}^+$ -Ionen, welche in der Probe



enthalten sind. Die hierbei erhaltene Signalverteilung ähnelt dem Ergebnis des IDA-EP-ICP-MS-Ansatzes.

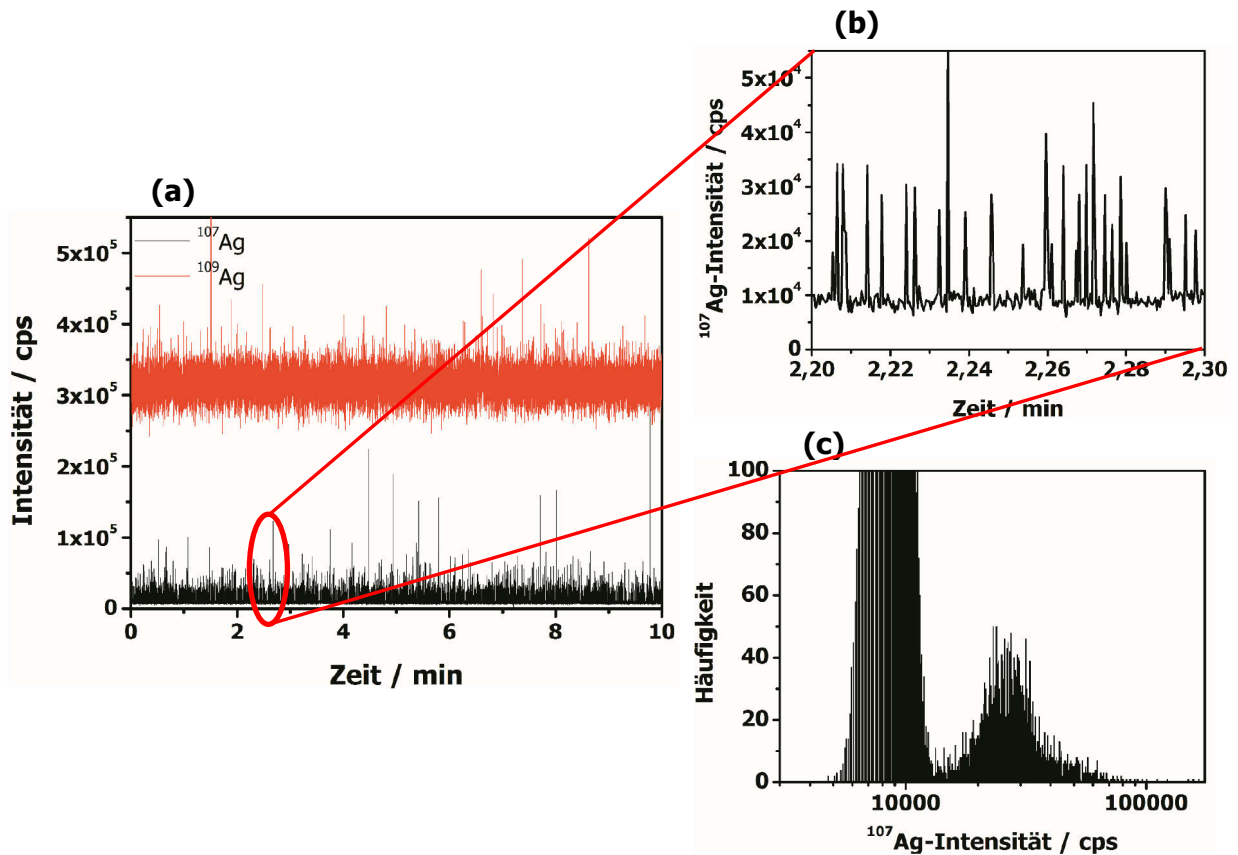


Abbildung 49 a-c: Zeitaufgelöste EP-ICP-MS-Signale der Probe NC40 ( $20,8 \pm 0,5 \text{ ng L}^{-1}$ ) und einer Zugabe von  $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  des <sup>109</sup>Ag-Standards für die Isotope <sup>107</sup>Ag und <sup>109</sup>Ag (a), im Detail (b) und das zugehörige Histogramm für <sup>107</sup>Ag (c). Die Transporteffizienz lag bei 6,3%.

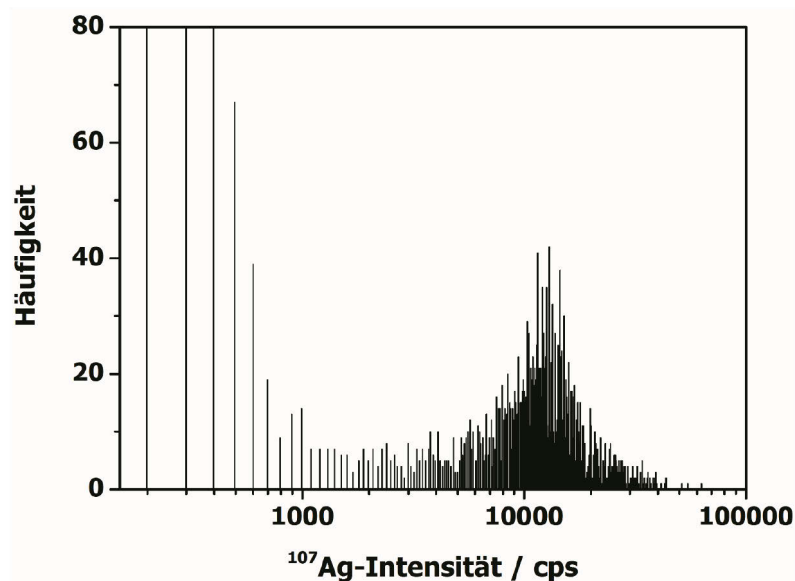
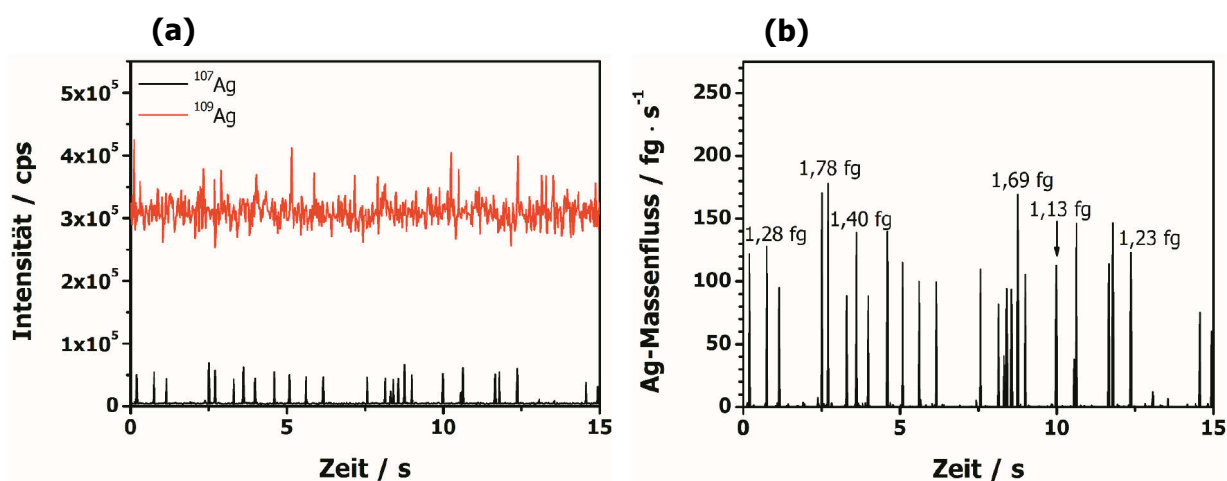


Abbildung 50: Histogramm der <sup>107</sup>Ag-Intensität der Probe NC40 für die konventionelle EP-ICP-MS.

Um aus den Intensitäten in Abbildung 50 im nächsten Schritt in Partikelmassen zu berechnen, wurde eine von Peters *et al.* [133] entwickelte Auswertungsdatei für EP-ICP-MS-Experimente für die IVA modifiziert. Hierbei wird ebenfalls zunächst visuell aus dem Histogramm der Signalintensitäten (siehe Abbildungen 49 c und 50) ein Grenzwert festgelegt, welcher die Signale in Untergrund- und Partikelsignal sortiert. In der konventionellen EP-ICP-MS entspricht der Untergrundwert den  $\text{Ag}^+$ -Ionen, in dem IVA-Ansatz den  $\text{Ag}^+$ -Ionen plus dem  $^{107}\text{Ag}$ -Anteil des IVA-Standards. Für beide Datenreihen wurde der Massenfluss mit Gleichung 47 berechnet und anschließend der Untergrund- vom NP-Wert abgezogen. Teilweise kam es dabei zu negativen Massenflusswerten, welche durch Schwankungen des IVA-Standard-Signals entstanden sind. Daher wurden die Berechnungen nur mit den positiven Werten fortgeführt.

Abbildungen 51 a und b stellen die zeitaufgelösten Signalintensitäten für einen 15 s langen Abschnitt (a) und die für die einzelnen Signale berechneten Partikelmassen (b) für NC60 NP dar. Hieraus ist die Analogie zwischen Signalintensität (a) und Partikelmasse (b) zu erkennen. Die einzelnen Partikelmassen jedes einzelnen NP werden aus der Multiplikation des Massenflusses mit der Integrationszeit erhalten. Da in beiden Graphiken die gleiche Anzahl an NP zu der gleichen Retentionszeit zu erkennen ist, bestätigt dies die Vorgehensweise.

Die so direkt erhaltenen Ag-Massen der einzelnen NP zwischen etwa 0,81 fg und 1,78 fg entsprechen Partikelgrößen von 53 nm bis 70 nm, basierend auf der Annahme sphärischer Teilchen. Dies ist ein großer Vorteil gegenüber der konventionellen EP-ICP-MS, in welcher die Signalintensitäten nur durch eine externe Kalibrierung in die einzelnen Partikelmassen umgewandelt werden können. Abbildung 51 b belegt somit die Durchführbarkeit des vorgeschlagenen Ansatzes. Der mittlere Partikeldurchmesser der analysierten NC60 NP (1312 NP) lag bei  $62 \pm 10$  nm. [134]



Abbildungen 51 a und b: 15 s langer Abschnitt der zeitaufgelösten EP-ICP-MS-Signalintensitäten (a) und des berechneten Massenflusses (b) für die Probe NC60 ( $29,3 \pm 0,5 \text{ ng L}^{-1}$ ) mit einer Zugabe von  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  des  $^{109}\text{Ag}$ -Standards.

### 5.6.5.2 *Vergleich der Isotopenverdünnungsanalyse-Einzelpartikel-ICP-MS mit der konventionellen Einzelpartikel-ICP-MS*

Im nächsten Schritt wurden die Partikeldurchmesser und -anzahlen des zuvor entwickelten IVA-EP-ICP-MS-Ansatzes mit der konventionellen EP-ICP-MS verglichen. Hierfür wurden Citrat-stabilisierte Ag-NP mit nominellen Durchmessern zwischen 30-80 nm analysiert. Dabei wurden verschiedene Konzentrationen des isotonenangereicherten  $^{109}\text{Ag}$ -Standards (zwischen  $0,1\text{--}4\ \mu\text{g L}^{-1}$ ) zu den Proben gegeben. Die erhaltenen Werte (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) der Partikeldurchmesser sind in Tabelle 21 zusammengestellt. Dabei ergibt sich über alle erhaltenen Werte ein Mittel von  $28,0 \pm 2,8\ \text{nm}$  für NC30,  $44,7 \pm 1,5\ \text{nm}$  für NC40,  $63 \pm 5\ \text{nm}$  für NC60 und  $83 \pm 8\ \text{nm}$  für NC80. Die Ergebnisse in Tabelle 21 legen nahe, dass die zugegebene Konzentration des IVA-Standards die Partikelgröße nicht beeinflusst. Dies würde bedeuten, dass vor der Analyse keine Informationen über den NP-Durchmesser benötigt werden. Weitere Experimente sind allerdings notwendig, um dies generell zu bestätigen. Weiterhin ist aus Tabelle 21 erkennbar, dass die erhaltenen Werte beider Ansätze gut übereinstimmen und keine signifikanten Unterschiede gefunden wurden.

Tabelle 21: Erhaltene Partikelgrößen (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) für die konventionelle EP-ICP-MS und die IVA-EP-ICP-MS ( $0,5\text{--}4\ \mu\text{g L}^{-1}\ ^{109}\text{Ag}$ ) für die untersuchten NP-Systeme.

NP-Durchmesser	NC30 / nm	NC40 / nm	NC60 / nm	NC80 / nm
EP-ICP-MS	$24 \pm 5$	$40 \pm 7$	$55 \pm 6$	$77 \pm 12$
IVA-EP-ICP-MS $0,1\ \mu\text{g L}^{-1}\ ^{109}\text{Ag}$	$31 \pm 9$	-	-	-
IVA-EP-ICP-MS $0,5\ \mu\text{g L}^{-1}\ ^{109}\text{Ag}$	$28 \pm 4$	$46 \pm 11$	$68 \pm 15$	-
IVA-EP-ICP-MS $1,0\ \mu\text{g L}^{-1}\ ^{109}\text{Ag}$	$26 \pm 4$	$44 \pm 9$	$62 \pm 10$	$89 \pm 37$
IVA-EP-ICP-MS $2,0\ \mu\text{g L}^{-1}\ ^{109}\text{Ag}$	-	$44 \pm 8$	$59 \pm 11$	$74 \pm 15$
IVA-EP-ICP-MS $4,0\ \mu\text{g L}^{-1}\ ^{109}\text{Ag}$	-	-	-	$86 \pm 15$

Zur Verdeutlichung sind die erhaltenen Partikelgrößenverteilungen beispielhaft für die Probe NC60 in Abbildung 52 dargestellt. Zusätzlich zur Partikelgröße wurde für die NC40, NC60 und NC80 NP auch die Partikelanzahl detektiert, welche in Tabelle 22 wiedergegeben ist. Für die IVA-EP-ICP-MS-Analysen in Tabelle 22 wurde zudem die Integrationszeit von 10 ms in Relation zur der Dauer eines gesamten Messzyklus von 22 ms gesetzt. Die so erhaltenen Anzahlkonzentrationen stimmen gut mit denen der normalen EP-Methode überein.

Es kann zusammengefasst werden, dass unter den gewählten Bedingungen für die untersuchten Ag-NP ähnliche Ergebnisse mittels IVA-EP-ICP-MS und der konventionellen EP-ICP-MS erhalten werden können. Somit ist dies ein vielversprechender Ansatz zur Analyse unbekannter, Ag-NP-haltiger Proben. [134]

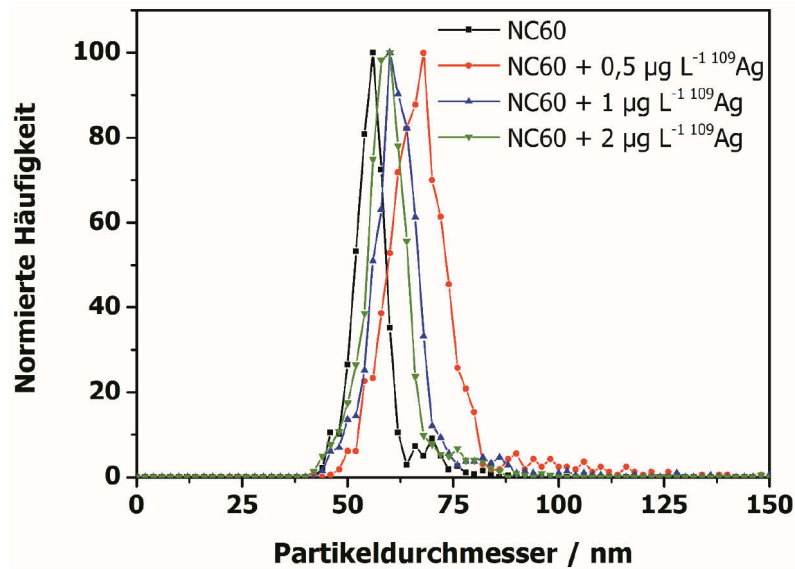


Abbildung 52: Partikelgrößenverteilungen der Probe NC60 (1:1.000.000 verdünnt) mittels EP-ICP-MS sowie IVA-EP-ICP-MS mit  $^{109}\text{Ag}$ -Konzentrationen von  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  und  $2 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Tabelle 22: Partikelanzahlkonzentrationen für die Ag-NP NC40, NC60 und NC80 für die konventionelle EP-ICP-MS (entnommen aus Tabelle 20, Kapitel 5.6.3) und die IVA-EP-ICP-MS ( $0,5\text{--}4 \mu\text{g L}^{-1} \text{ }^{109}\text{Ag}$ ).

NP-Anzahlkonzentration	NC40 / NP L <sup>-1</sup>	NC60 / NP L <sup>-1</sup>	NC80 / NP L <sup>-1</sup>
EP-ICP-MS	$2,6 \times 10^{13}$	$1,2 \times 10^{13}$	$7,1 \times 10^{12}$
IVA-EP-ICP-MS $0,5 \mu\text{g L}^{-1} \text{ }^{109}\text{Ag}$	$2,9 \times 10^{13}$	$1,4 \times 10^{13}$	-
IVA-EP-ICP-MS $1,0 \mu\text{g L}^{-1} \text{ }^{109}\text{Ag}$	$2,6 \times 10^{13}$	$1,4 \times 10^{13}$	$7,3 \times 10^{12}$
IVA-EP-ICP-MS $2,0 \mu\text{g L}^{-1} \text{ }^{109}\text{Ag}$	$2,9 \times 10^{13}$	$1,4 \times 10^{13}$	$7,3 \times 10^{12}$
IVA-EP-ICP-MS $4,0 \mu\text{g L}^{-1} \text{ }^{109}\text{Ag}$	-	-	$6,2 \times 10^{12}$

### 5.6.5.3 Einfluss der Matrix in der Einzelpartikel-ICP-MS

Die externe Kalibrierung der konventionellen EP-ICP-MS berücksichtigt keine möglicherweise bei der Analyse von Ag-NP in komplexer Matrix auftretende Matrixeffekte, wodurch es zu Fehlern in der Massenbestimmung (und folglich auch der Partikelgröße) kommen kann. [133] In Abbildungen 53 a und b sind der Vergleich einer Analyse der NC40 NP in Reinstwasser (a) und in einer 30 mM NaCl-Lösung (b) dargestellt. Aus dem Vergleich der zeitaufgelösten Signale in Abbildungen 53 a und b geht hervor, dass durch die Zugabe einer 30 mM NaCl-Lösung etwa 50% geringere Signalintensitäten als in Reinstwasser erhalten werden. Unter der Verwendung der gleichen externen Kalibrierung kann dies zu signifikanten Fehlern in der Berechnung der Partikelgröße führen.

Wichtige Vorteile des IVA-Ansatzes sind, dass Matrixeffekte, welche die Empfindlichkeit des Gerätes stark beeinflussen können, und die Gerätedrift kompensiert werden können. Dies

soll für die zuvor optimierte IVA-EP-ICP-MS-Methode überprüft werden. Dafür wurde eine verdünnte Meerwassermatrix in Form von 30 mM NaCl simuliert. Zunächst wurde der Einfluss dieser Matrix auf die Intensität in Abbildungen 54 a (ohne Matrix) und b (mit Matrix) untersucht. Aus Abbildungen 54 a und b ist erkennbar, dass die zeitaufgelösten Signalintensitäten für beide Isotope durch die Zugabe der Matrix um annähernd 70% gesenkt wurden.

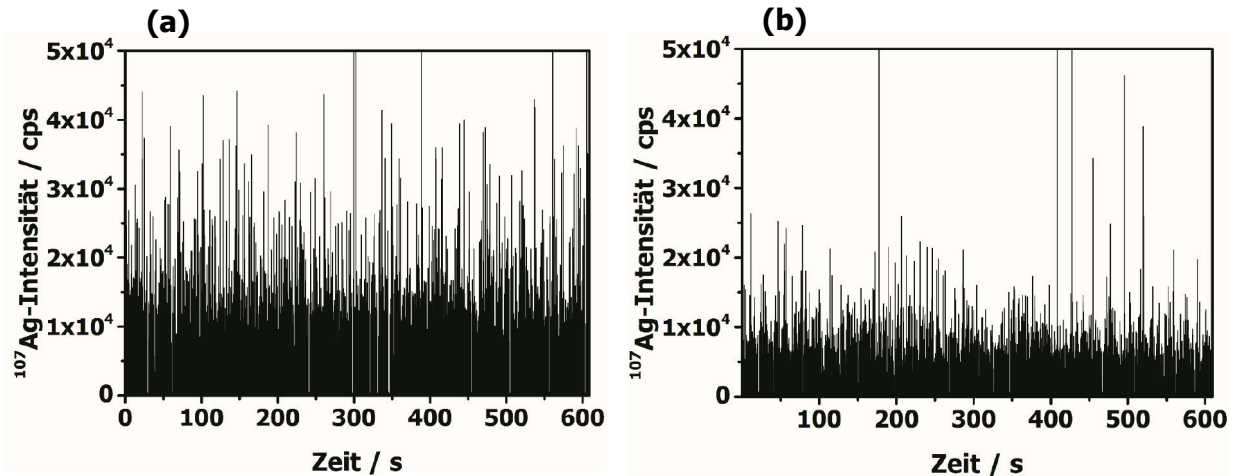
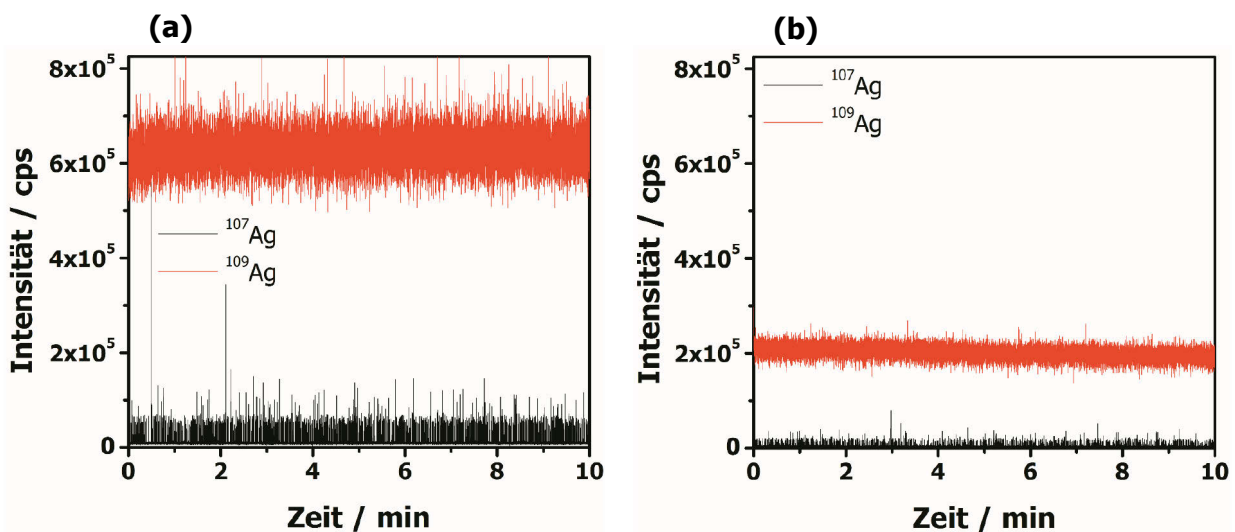


Abbildung 53 a und b: Zeitaufgelöste EP-ICP-MS-Signale der 1:2.500.000 verdünnten Probe NC40 in Reinstwasser (a) und 30 mM NaCl (b).



Abbildungen 54 a und b: Einfluss der 30 mM NaCl-Matrix auf die IVA-EP-ICP-MS-Signalintensitäten, a: ohne Matrix, b: mit Matrix.

Um den Einfluss der Matrix auf die erhaltenen Partikelgrößen für den konventionellen und den IVA-Ansatz zu verdeutlichen, sind die Größenverteilungen der Probe NC60 in Abbildung 55 dargestellt. Aus dieser ist ersichtlich, dass sehr ähnliche Größenverteilungen für alle Histogramme, außer für das konventionelle EP-ICP-MS-Experiment, beobachtet werden konnten. Für Letzteres wurde ein signifikanter Einfluss mit einer Partikelreduktion von 55 nm

(ohne Matrix) auf 40 nm (mit Matrixzugabe) erhalten. In Tabelle 23 sind die erhaltenen Mittelwerte und ihre Verteilungen sowie die Mediane aufgelistet.

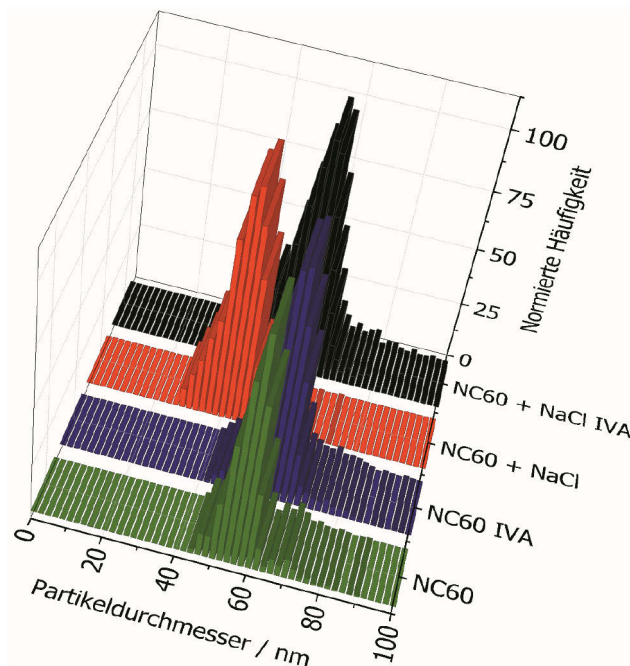


Abbildung 55: Größenverteilungen mittels konventioneller und IVA-EP-ICP-MS mit und ohne Matrixzugabe.

Tabelle 23: Vergleich der erhaltenen Partikeldurchmesser (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, Median in Klammern) mit und ohne Matrix.

	NC40 / nm	NC60 / nm	NC80 / nm
EP-ICP-MS in Reinstwasser	40 $\pm$ 7 (40)	55 $\pm$ 6 (55)	77 $\pm$ 12 (75)
EP-ICP-MS in 30 mM NaCl	33 $\pm$ 7 (33)	40 $\pm$ 6 (40)	52 $\pm$ 9 (52)
IVA-EP-ICP-MS in Reinstwasser	44 $\pm$ 9 (43)	59 $\pm$ 11 (58)	86 $\pm$ 15 (83)
IVA-EP-ICP-MS in 30 mM NaCl	40 $\pm$ 12 (38)	55 $\pm$ 8 (55)	78 $\pm$ 14 (76)

Die Ergebnisse in Tabelle 23 bestätigen die Tendenz aus Abbildung 55 mit 18-32% kleineren Durchmessern für die EP-ICP-MS-Analysen in Matrix. Im Gegensatz dazu stimmen die Werte der drei anderen Methoden gut überein. Dies verdeutlicht erneut die Wichtigkeit der Berücksichtigung von Matrixeffekten, um zuverlässige Analysenergebnisse zu erhalten. [133] Im Gegensatz zu den konventionellen EP-ICP-MS-Ergebnissen in Tabelle 23 wurden die mittels IVA-EP-ICP-MS erhaltenen Werte weniger durch die Matrix beeinflusst. Ein etwas kleiner Durchmesser von etwa 10% konnte jedoch nach der Matrixzugabe beobachtet werden. Die IVA ist zwar in der Lage, Matrixeffekte zu kompensieren, jedoch könnte die beobachtete Tendenz durch eine Änderung der Transporteffizienz verursacht werden, welche wiederum nicht durch die IVA ausgeglichen werden kann. Die Transporteffizienz mit und ohne Matrix lag bei 6,1% bzw. 7,3%. Letzterer liegt etwas höher als der zuvor beschriebene Wert von 6,3%

ohne Matrix (siehe Kapitel 5.6.5.2), was aber durch den Austausch der Probenschläuche und des Zerstäubers hervorgerufen worden sein kann. Zudem wurde beobachtet, dass die Signalintensität der NP stärker durch die Matrix beeinflusst wird als die des IVA-Standards. Dadurch kommt es zur Berechnung kleinerer Durchmesser. Für die NC60 NP wurden mittlere Intensitäten von 628.478 cps für den IVA-Standard ohne und 201.610 cps mit Matrix erhalten, welche einem Verhältnis von 3,1:1 entsprechen. Die NP zeigten mittlere Intensitäten von 55.576 cps ohne und 16.901 cps mit Matrix, mit einem Verhältnis von 3,3:1. Die Werte der NC40 und NC80 NP bestätigen diese Tendenz, mit Verhältnissen von 2,2 (NC40, IVA-Standard), 2,5 (NC40, NP), 3,5 (NC80, IVA-Standard) und 3,9 (NC80, NP).

Sowohl für die konventionellen EP-ICP-MS als auch die IVA-EP-ICP-MS-Experimente sind gleiche Transport- und Atomisierungseffizienzen für den Standard und die Proben essentiell. Die präsentierten Ergebnisse deuten darauf hin, dass dieses jedoch nicht immer gegeben ist. Diese beiden Faktoren wurden bereits für das sogenannte Slurry Sampling, das Suspendieren von Feststoffpartikeln (zumeist im  $\mu\text{m}$ -Bereich) in einer flüssigen Matrix, hinreichend untersucht. [168] Beispielsweise zeigten O'Hanlon *et al.*, dass Partikel mit einer Größe von 3-4  $\mu\text{m}$  in einem Slurry eine kleinere Transporteffizienz als eine Lösung des gleichen Elementes haben können. [169] Parallelen zwischen dem Slurry Sampling und dem EP-ICP-MS-Ansatz sind demnach denkbar, jedoch sind weitere Studien dazu nötig.

Da die IVA nicht in der Lage ist, einen möglichen Einfluss auf die Transporteffizienz auszugleichen, sollte dieses sowie der unterschiedliche Einfluss der Matrix auf den IVA-Standard und die NP weiter untersucht werden. Diese könnten auch den Ionisationsbereich im Plasma für Standardlösungen und NP beinhalten. [134]

Eine weitere Möglichkeit wäre die Verwendung eines Mikrotröpfchen-Erzeugers mit einer Transporteffizienz von nahezu 100%. [170] Weitere Ansätze könnte eine Übertragung der entwickelten Methode auf ein Multikollektor-ICP-MS mit niedrigeren Nachweisgrenzen oder ein ICP-ToF-MS mit der Möglichkeit, mehrere Isotope simultan zu messen, beinhalten, welche vielversprechende, neue Ansätze für die NP-Analytik liefern könnten.

## 5.7 Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Die zuvor entwickelte EP-ICP-MS ist in der Lage, den Gehalt an  $\text{Ag}^+$ -Ionen zu bestimmen. Jedoch fehlt eine Validierung der erhaltenen Ergebnisse. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher die von Soto Alvaredo *et al.* entwickelte HPLC-ICP-MS-Methode [24] zur Trennung von NP und deren Ionen untersucht und um eine Quantifizierungsmethode ergänzt werden. Weiterhin sollte der Trennmechanismus aufgeklärt werden.

Ein Chromatogramm der Probe BAM N-001 unter den publizierten Messbedingungen ist in Abbildung 56 dargestellt.

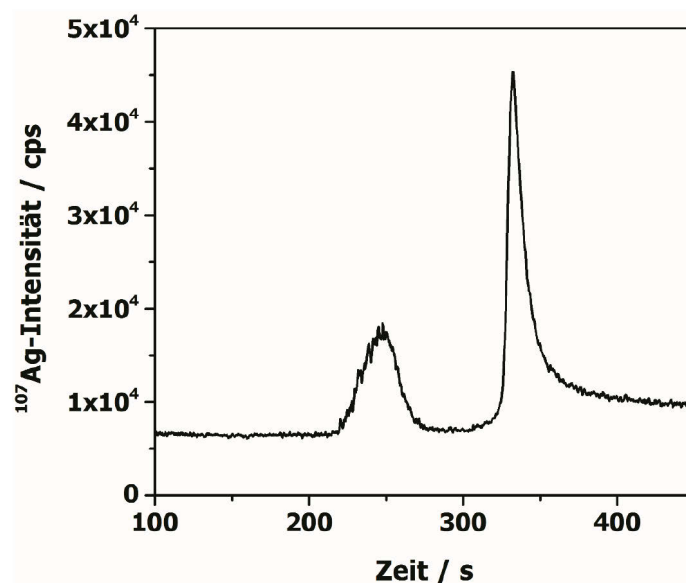


Abbildung 56: HPLC-ICP-MS-Chromatogramm der Probe BAM N-001 (NUCLEOSIL® 1000-7 C18-Säule, Eluent 10 mM SDS, 10 mM Ammonium Acetat und 1 mM Natriumthiosulfat nach [24]).

Nach einem Vergleich mit einer Ag-Standardlösung sowie NIST Au-NP können die in Abbildung 56 zu erkennenden zwei Peaks, den Ag-NP bei einer Retentionszeit von 248 s und den  $\text{Ag}^+$ -Ionen bei 332 s zugeordnet werden. Unter der Annahme, dass die NP und das  $\text{Ag}^+$  die gleiche Wiederfindungsrate aufweisen, ergibt sich in diesem Fall ein Gehalt an  $\text{Ag}^+$ -Ionen von 65,1%. Dieser Wert liegt damit deutlich über dem zuvor ermittelten Wert von  $7,87 \pm 0,10\%$  (Kapitel 5.4.6) sowie den von Fabricius *et al.* publizierten Werten, die zwischen etwa 6-36% liegen. [145] Dieses Ergebnis deutet somit auf ein Auflösen der NP in dem verwendeten Eluenten oder einen Verbleib im Säulenmaterial hin. [143]

### 5.7.1 Eluentenoptimierung

Um möglichst hohe Intensitäten sowohl für die NP wie auch die  $\text{Ag}^+$ -Ionen zu erhalten und ein mögliches Auflösen der NP zu vermeiden, wurde der Eluent optimiert.



Die Absenkung des pH-Wertes von 6,8 auf 5,1 bzw. 3,5 resultierte in einer schlechteren Trennung der NIST10 und NIST30 Au-NP. Die daraufhin durchgeführte Variation der Natriumthiosulfat-Konzentration (zur Stabilisierung) zwischen 1-0,25 mM führte mit abnehmender Konzentration zu einer deutlichen Verkleinerung der Peakflächen um bis zu 60% (Ag-NP-Peak) bzw. 95% ( $\text{Ag}^+$ -Peak, nicht gezeigt). Da Natriumthiosulfat offensichtlich ungeeignet war, wurde dieses durch Penicillamin (PA) ersetzt, welches in der Literatur bereits erfolgreich zur Stabilisierung von  $\text{Au}^+$ - und  $\text{Ag}^+$ -Ionen verwendet wurde. [171] Abbildung 57 stellt die Chromatogramme der Optimierung der PA-Konzentration unter Verwendung von einer Mischung aus NC20, S10 und Ag-Standard als Probe dar.

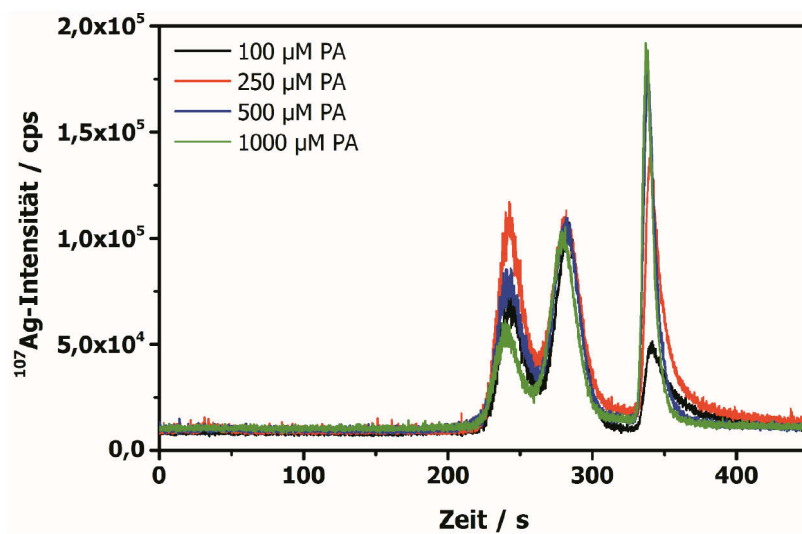


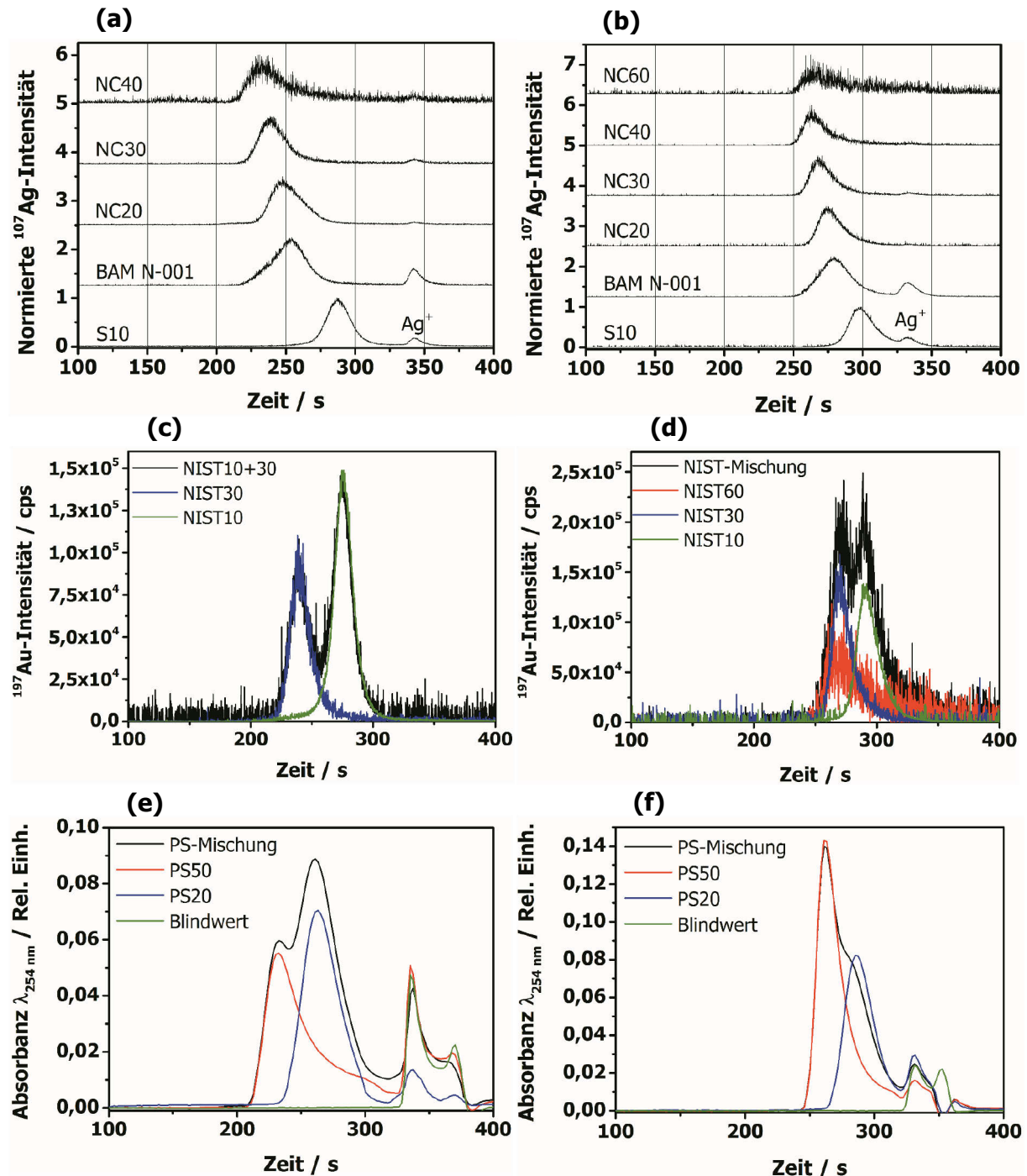
Abbildung 57: Optimierung der PA-Konzentration (100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  und 1000  $\mu\text{M}$  PA) im Eluenten unter Verwendung einer Mischung von NC20 (10,1  $\mu\text{g L}^{-1}$ , Links), S10 (11,2  $\mu\text{g L}^{-1}$ , Mitte) und eines Ag-Standard (5  $\mu\text{g L}^{-1}$ , Rechts) als Probe.

Die Chromatogramme in Abbildung 57 zeigen, dass mit steigender PA-Konzentration die Peakhöhe und -fläche des  $\text{Ag}^+$ -Ionen-Peaks (bei 332 s) ebenfalls ansteigt. Dies deutet auf eine bessere Stabilisierung hin. Im Gegensatz dazu nahm die Peakhöhe und -fläche der NC20 NP ab, was auf deren Auflösung hinweisen könnte. Da für eine PA-Konzentration von 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  intensive Signale sowohl für die NP als auch die  $\text{Ag}^+$ -Ionen erhalten wurden, wurden diese für alle weiteren Experimente verwendet. [143]

### 5.7.2 Trennung

Für diese Bedingungen wurde die Trennung anhand zweier Säulen mit Porendurchmessern von 1000 Å bzw. 4000 Å verglichen. Die Ergebnisse sind in den Chromatogrammen in Abbildungen 58 a-f aufgezeigt. Aus den Chromatogrammen lässt sich schlussfolgern, dass NP mit mittleren hydrodynamischen Durchmessern zwischen 18-55 nm (1000 Å-Säule) und 18-74 nm (4000 Å-Säule) größtenteils basisliniengetrennt werden. Somit konnte diese

Methode für verschiedene anorganische (Ag, Au) und organische (PS) NP erfolgreich angewandt werden. [143]



Abbildungen 58 a-f: Chromatogramme der Ag-NP (a und b), Au-NP (c und d) und PS-NP (e und f) für die 1000 Å- (a, c und e) und 4000 Å-Säule (b, d und f). Die Partikelgröße nimmt mit steigender Retentionszeit, entsprechend der GPC-Theorie ab.

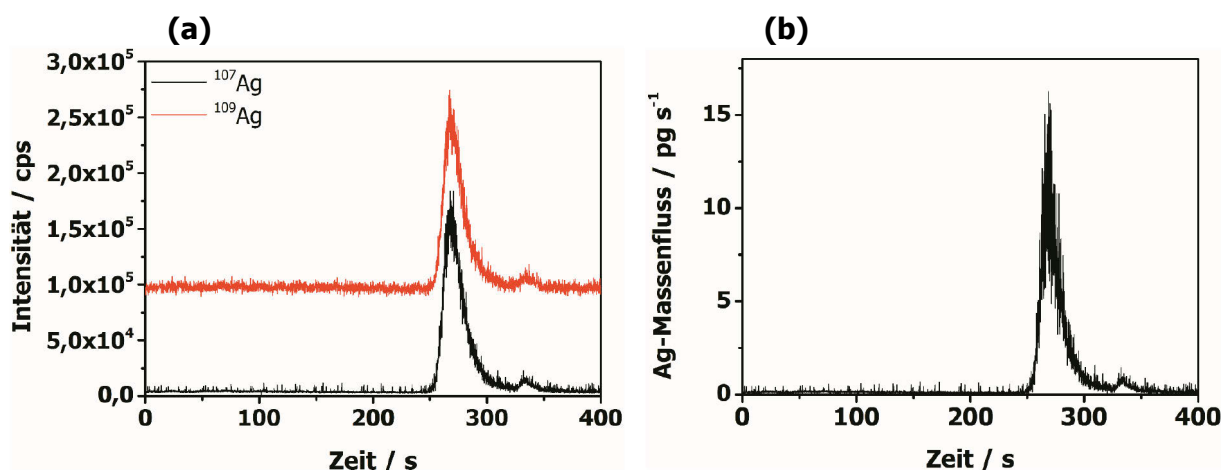
Im Vergleich zu der FFF können mittels der HPLC-ICP-MS alle untersuchten NP-Systeme mit der gleichen Methode analysiert werden. Zudem ist die HPLC-Methode schneller und in der Lage, NP und ihre korrespondierenden Ionen zu trennen.

### 5.7.3 Quantifizierung

Das Ziel der Quantifizierung war eine schnelle, matrixunabhängige und nahezu parallele Quantifizierung der NP und deren Ionen. Daher wurde erneut die IVA als Quantifizierungsmethode gewählt.

Zunächst wurde das Volumen der Injektionsschleife mittels IVA und einer wässrigen Ag-Standardlösung bestimmt. Dabei ergab sich ein Wert von  $23,4 \pm 0,8 \mu\text{L}$ . Anschließend wurden die Systemwiederfindungsraten der Proben durch ein Überbrücken der Säule bestimmt. Diese lagen bei  $94 \pm 5\%$  (S10),  $83,0 \pm 2,5\%$  (NC20),  $88 \pm 5\%$  (NC30) und  $103,5 \pm 2,6\%$  (NC40). Verluste können im Totvolumen des Injektionsventils und in den Kapillaren zum ICP-MS auftreten.

Ein typisches HPLC-IVA-ICP-MS-Chromatogramm (a) und das entsprechende Massenfluss-Chromatogramm (b) sind in den Abbildungen 59a und b dargestellt.



Abbildungen 59 a und b: Typisches Chromatogramm (a) und Massenfluss-Chromatogramm (b) am Beispiel von der Probe NC30 ( $11,3 \text{ mg L}^{-1}$ , 4000 Å-Säule).

Sowohl in den Chromatogrammen der beiden Ag-Isotope in Abbildung 59 a als auch aus dem Massenfluss-Chromatogramm in Abbildung 59 b lassen sich die Ag-NP-Peaks gut erkennen.

Durch eine Integration der Peakflächen und die Berücksichtigung des injizierten Probenvolumens lassen sich die Konzentration der Ag-NP, der Gehalt an  $\text{Ag}^+$ -Ionen und der Ag-Gesamtgehalt berechnen (siehe Tabellen 24 (1000 Å-Säule) und 25 (4000 Å-Säule)). Zur besseren Darstellung wurden aus den Werten in Tabellen 24 und 25 die Wiederfindungsraten berechnet. Zhou *et al.* beschrieben unterschiedliche Wiederfindungsraten für die  $\text{Ag}^+$ -Ionen und Ag-NP unter der Verwendung einer mit Aminogruppen modifizierten Säule. [23] Daher wurden hier die Wiederfindungsraten einer wässrigen Ag-Standardlösung mittels Gleichung 42 berechnet. Diese betrugen  $90 \pm 7\%$  (1000 Å) und  $104,5 \pm 1,9\%$  (4000 Å).

Tabelle 24: Ermittelte Ag-NP, Ag<sup>+</sup>-Ionen- und Gesamt-Ag-Konzentration für die 1000 Å-Säule.

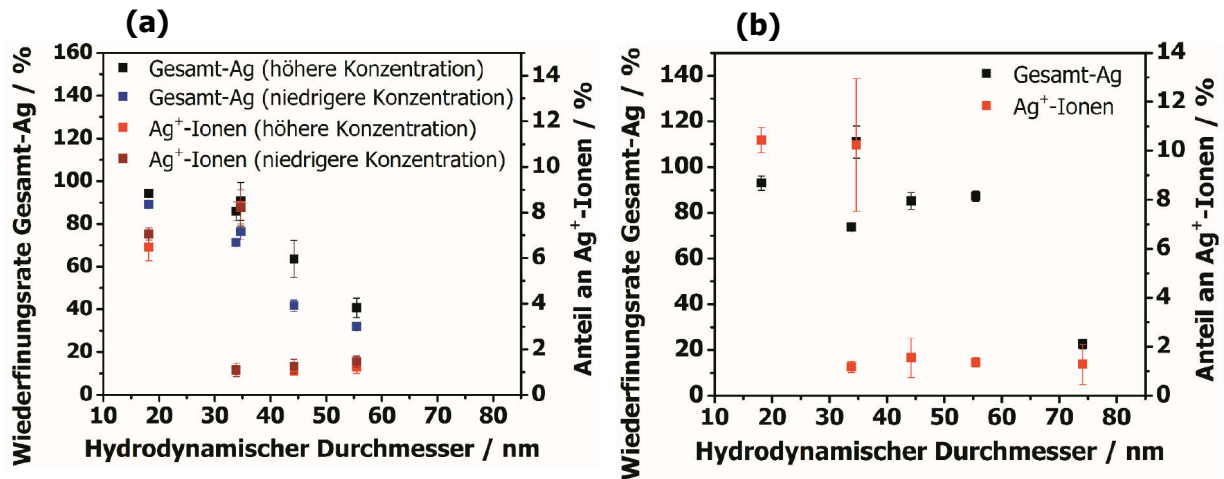
Probe	Injizierte Ag-Konzentration / $\mu\text{g L}^{-1}$	Ermittelte Ag-NP-Konzentration / $\mu\text{g L}^{-1}$	Ermittelte Ag <sup>+</sup> -Ionen-Konzentration / $\mu\text{g L}^{-1}$	Ermittelte Gesamt-Ag-Konzentration / $\mu\text{g L}^{-1}$
S10	5,61	4,64 ± 0,09	0,36 ± 0,01	4,99 ± 0,09
	11,22	9,91 ± 0,10	0,66 ± 0,06	10,58 ± 0,10
NC20	20,16	14,29 ± 0,18	0,20 ± 0,05	14,49 ± 0,14
	100,82	86 ± 5	0,98 ± 0,16	87 ± 5
NC30	22,63	9,2 ± 0,6	0,25 ± 0,06	9,5 ± 0,6
	113,16	71 ± 10	1,06 ± 0,19	72 ± 10
NC40	20,79	6,4 ± 0,4	0,27 ± 0,05	6,7 ± 0,4
	103,93	41 ± 5	1,12 ± 0,25	42 ± 5
BAM N-001	62,52	21,6 ± 1,0	2,30 ± 0,22	23,9 ± 1,2
	31,31	52 ± 6	4,7 ± 0,4	57 ± 6

Tabelle 25: Ermittelte Ag-NP, Ag<sup>+</sup>-Ionen- und Gesamt-Ag-Konzentration für die 4000 Å-Säule.

Probe	Injizierte Ag-Konzentration / $\mu\text{g L}^{-1}$	Ermittelte Ag-NP-Konzentration / $\mu\text{g L}^{-1}$	Ermittelte Ag <sup>+</sup> -Ionen-Konzentration / $\mu\text{g L}^{-1}$	Ermittelte Gesamt-Ag-Konzentration / $\mu\text{g L}^{-1}$
S10	11,22	9,2 ± 0,5	1,17 ± 0,06	10,4 ± 0,4
NC20	10,08	7,32 ± 0,16	0,12 ± 0,02	7,43 ± 0,14
NC30	11,32	9,5 ± 0,6	0,17 ± 0,09	9,6 ± 0,5
NC40	20,79	17,9 ± 0,5	0,28 ± 0,04	18,1 ± 0,5
NC60	29,31	6,1 ± 0,7	0,50 ± 0,03	6,6 ± 0,7
BAM N-001	31,31	30,7 ± 1,1	3,2 ± 0,9	33,9 ± 1,9

In Abbildung 60 a (1000 Å) und b (4000 Å) sind die Wiederfindungsraten der Gesamt-Ag-Konzentration basierend auf den Werten des sauren Aufschlusses (siehe Tabelle 4, Kapitel 5.2) sowie der Anteil an Ag<sup>+</sup>-Ionen in Abhängigkeit der Partikelgröße dargestellt. Daraus sind sinkende Wiederfindungsraten mit steigender Partikelgröße zu erkennen. Für die 4000 Å-Säule in Abbildung 60 b konnten konstante Werte für Größen zwischen 18-55 nm erhalten werden. Größere Partikel (z.B. NC60 mit 71,4 nm Durchmesser) haben eine geringere Wiederfindungsrate. Dies deutet auf einen Wechsel des Trennmechanismus hin, welcher in Kapitel 5.7.4 genauer diskutiert wird. Der überraschend hohe Wert von über 100% für die BAM N-001 NP (4000 Å) könnte an einer etwas höheren Varianz des Rauschens des <sup>109</sup>Ag-Standards liegen. Für die BAM N-001 NP wurde ein Anteil an Ag<sup>+</sup>-Ionen von 8,3 ± 0,7% (62,5  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 1000 Å), 8,2 ± 0,8% (31,3  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 1000 Å) und 10,2 ± 2,7% (31,3  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 4000 Å) ermittelt. Diese Werte stimmen gut mit dem zuvor mittels Ultrafiltration bestimmten Wert von 7,8 ± 0,1% (siehe Kapitel 5.4.6) und den von Fabricius *et al.* publizierten Werten von ca. 6-36% [145]

überein. Für die NC20 NP konnte auch eine gute Überstimmung mit dem mittels EP-ICP-MS bestimmten Gehalt an  $\text{Ag}^+$ -Ionen von 12,0% gefunden werden. Für die NC30, NC40, NC60 und NC80 NP lagen die Werte der EP-ICP-MS (Tabelle 20, Kapitel 5.6.4) deutlich über denen der HPLC. Durch die hohe Verdünnung und möglicherweise unzureichende Stabilisierung könnte ein Auflösen der NP zu einem zu hohen  $\text{Ag}^+$ -Anteil führen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die HPLC-Methode als zuverlässigste und schnellste aller untersuchten Methoden zur Ermittlung des Gehaltes an  $\text{Ag}^+$ -Ionen einer Ag-NP-Probe angesehen werden kann.



Abbildungen 60 a und b: Wiederfindungsraten des Gesamt-Ag und der Anteil an  $\text{Ag}^+$ -Ionen für die 1000 Å- (a) und 4000 Å-Säule (b).

Die Wiederholbarkeit der Retentionszeiten und die NWG der analysierten NP-Systeme sind in den Tabellen 26 (1000 Å) und 27 (4000 Å) aufgeführt. Im Falle der 1000 Å-Säule steigt die NWG mit der Partikelgröße. Die 4000 Å-Säule zeigt nur für die größten, analysierten NP einen Anstieg der NWG. Zudem wurden gute Wiederholbarkeiten der Retentionszeiten erhalten. [143]

#### 5.7.4 Trennmechanismus

Helfrich *et al.* beschrieben den Trennmechanismus einer ähnlichen HPLC-Methode als GPC-Mechanismus. [34] Abbildungen 58 a-f verdeutlichen, dass auch im Rahmen dieser Arbeit größere Analyten vor kleineren eluieren, was auf ein ähnliches Verhalten hindeutet. Charakteristische Werte von GPC-Säulen sind die Ausschluss- und Permeationsgrenze. [119] Diese Werte können der Auftragung in Abbildung 61 entnommen werden.

Die Permeationsgrenzen wurden über das Retentionsvolumen in Abbildung 61 bestimmt und betragen 2,9 mL (1000 Å) und 2,8 mL (4000 Å). Beide Säulen weisen einen linearen Trennbereich auf. Allerdings eluieren in der 4000 Å-Säule Partikel mit Durchmessern von 54,1 nm (PC50) und 55,5 nm (NC40) zusammen mit den etwas größeren NIST60 (72,8 nm) und NC60 NP (74,1 nm) bei einem Retentionsvolumen von ca. 2,2 mL. Die entsprechenden

Chromatogramme der NP in Abbildungen 58 b und d zeigen einen steileren Peak mit einer ausgeprägten Schulter und geringer Intensität auf. Dies könnte auf die Elution von kleineren NP-Fractionen deuten und auf einen Verbleib der größeren Partikel auf der Säule. Ein derartiges Verhalten würde zu der beobachteten Verschiebung des Peakmaximums zu kleineren Retentionsvolumina führen. Diese Vermutung wird ebenfalls durch die geringe Wiederfindungsrate von 22,6% für die NC60 NP unterstützt.

Die 1000 Å-Säule zeigt eine sinkende Wiederfindungsrate mit steigender Größe (siehe Abbildung 60 a), welche durch Interaktionen des Säulenmaterials mit dem Analyten verursacht wird. Größere NP als in Abbildungen 60 a und b sowie Abbildungen 58 a-f dargestellt verblieben vollständig auf den Säulen. Daher war eine Bestimmung der Ausschlussgrenze nicht möglich. Mit steigender NP-Größe steigt das Zetapotential (siehe Tabelle 5, Kapitel 5.3) sowie die Möglichkeit sterischer Interaktionen, somit könnten die NP mit dem Säulenmaterial, besonders den 1000 Å-Poren, interagieren. Eine weitere mögliche Erklärung könnte die Partikelgrößen-abhängige Bindungsenergie von Oberflächenliganden an die Partikel darstellen, welche zu einer Partikelgrößen-spezifischen Stabilität und Aggregation führt. [172]

Tabelle 26: Wiederholbarkeit der Retentionszeiten der Ag-NP- und Ionen- bzw. SDS-Peaks sowie die NWG für die 1000 Å-Säule.

Probe	Injizierte Ag-Konzentration	Retentionszeit NP-Peak / s	Retentionszeit Ag <sup>+</sup> - / SDS-Peak / s	NWG / µg L <sup>-1</sup>
S10	5,61 µg L <sup>-1</sup>	286,8 ± 0,8	339,7 ± 3,0	0,09
	11,22 µg L <sup>-1</sup>	287,2 ± 0,9	339 ± 5	0,10
NC20	20,16 µg L <sup>-1</sup>	246,6 ± 1,3	342,8 ± 0,8	0,23
	100,82 µg L <sup>-1</sup>	246,4 ± 0,9	342,7 ± 0,8	0,49
NC30	22,63 µg L <sup>-1</sup>	237,4 ± 1,3	341,7 ± 1,5	0,74
	113,16 µg L <sup>-1</sup>	237,7 ± 1,1	342,3 ± 0,8	1,81
NC40	20,79 µg L <sup>-1</sup>	232,0 ± 1,6	343 ± 4	1,13
	103,93 µg L <sup>-1</sup>	231,0 ± 1,2	342,7 ± 0,9	3,73
BAM N-001	62,52 µg L <sup>-1</sup>	252,6 ± 1,2	342,3 ± 0,2	0,57
	31,31 µg L <sup>-1</sup>	252,5 ± 1,8	342,6 ± 0,4	0,99
PS-Blindwert	-	-	335,27 ± 0,02*; 370,21 ± 0,02*	
PS20	200 mg L <sup>-1</sup>	263,18 ± 0,05	337,44 ± 0,05*; 368,7 ± 2,6*	
PS50	100 mg L <sup>-1</sup>	232,61 ± 0,04	335,6 ± 0,7*; 369,8 ± 0,6*	
PS-Mischung	Siehe oben	263,22 ± 0,04#; 228,28 ± 0,04#	336,8 ± 1,3*; 368,8 ± 1,2*	
NIST10	10,31 µg L <sup>-1</sup>	275,2 ± 0,7		
NIST30	9,63 µg L <sup>-1</sup>	239,3 ± 0,8		
NIST10+30	Siehe oben	274,9 ± 1,3#; 238,8 ± 0,4#		

\* Peaks vom SDS, # Peaks der NP-Mischungen

Tabelle 27: Wiederholbarkeit der Retentionszeiten der Ag-NP- und Ionen- bzw. SDS-Peaks sowie die NWG für die 4000 Å-Säule.

Probe	Injizierte Ag-Konzentration	Retentionszeit NP-Peak / s	Retentionszeit Ag <sup>+</sup> -/SDS-Peak / s	NWG / µg L <sup>-1</sup>
S10	11,22 µg L <sup>-1</sup>	298,3 ± 0,5	333,1 ± 0,5	0,35
NC20	10,08 µg L <sup>-1</sup>	273,6 ± 2,0	333,3 ± 2,2	0,39
NC30	11,32 µg L <sup>-1</sup>	267,2 ± 1,9	332,3 ± 1,0	0,26
NC40	20,79 µg L <sup>-1</sup>	263,7 ± 0,7	334,8 ± 1,6	0,37
NC60	29,31 µg L <sup>-1</sup>	266 ± 4	331,7 ± 0,4	3,39
BAM N-001	31,31 µg L <sup>-1</sup>	280,0 ± 1,8	335,0 ± 2,8	0,37
PS-Blindwert			330,89 ± 0,03*; 352,73 ± 0,03*	
PS20	200 mg L <sup>-1</sup>	285,06 ± 0,04	331,2 ± 0,4*	
PS50	100 mg L <sup>-1</sup>	261,06 ± 0,06 <sup>#</sup>	331,7 ± 1,2*	
PS-Mischung	Je 100 mg L <sup>-1</sup>	260,99 ± 0,06 <sup>#</sup>	332,3 ± 1,2*	
NIST10	10,31 µg L <sup>-1</sup>	291,2 ± 0,3		
NIST30	9,63 µg L <sup>-1</sup>	271,6 ± 0,9		
NIST60	103,72 µg L <sup>-1</sup>	270,5 ± 2,4		
NIST-Mischung	Siehe oben	290,6 ± 2,3 <sup>#</sup> ; 268,1 ± 0,9 <sup>#,+</sup>		

\* Peaks vom SDS, # Peaks der NP-Mischungen, + schlechte Auflösung der NIST-Mischung

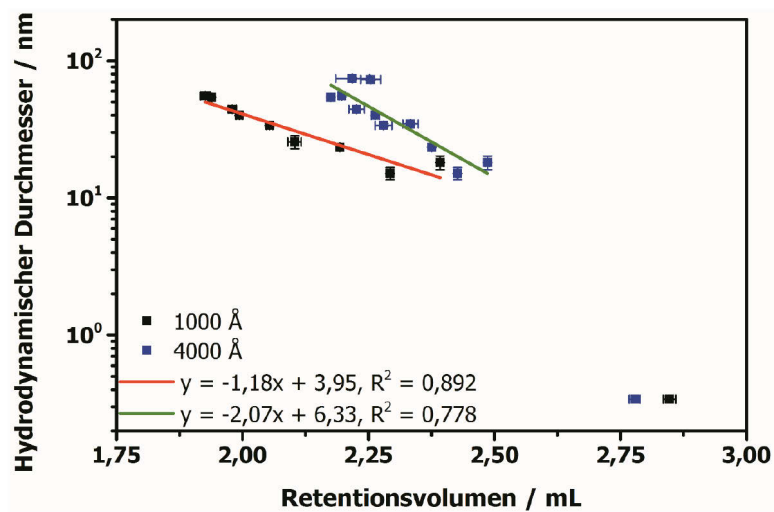
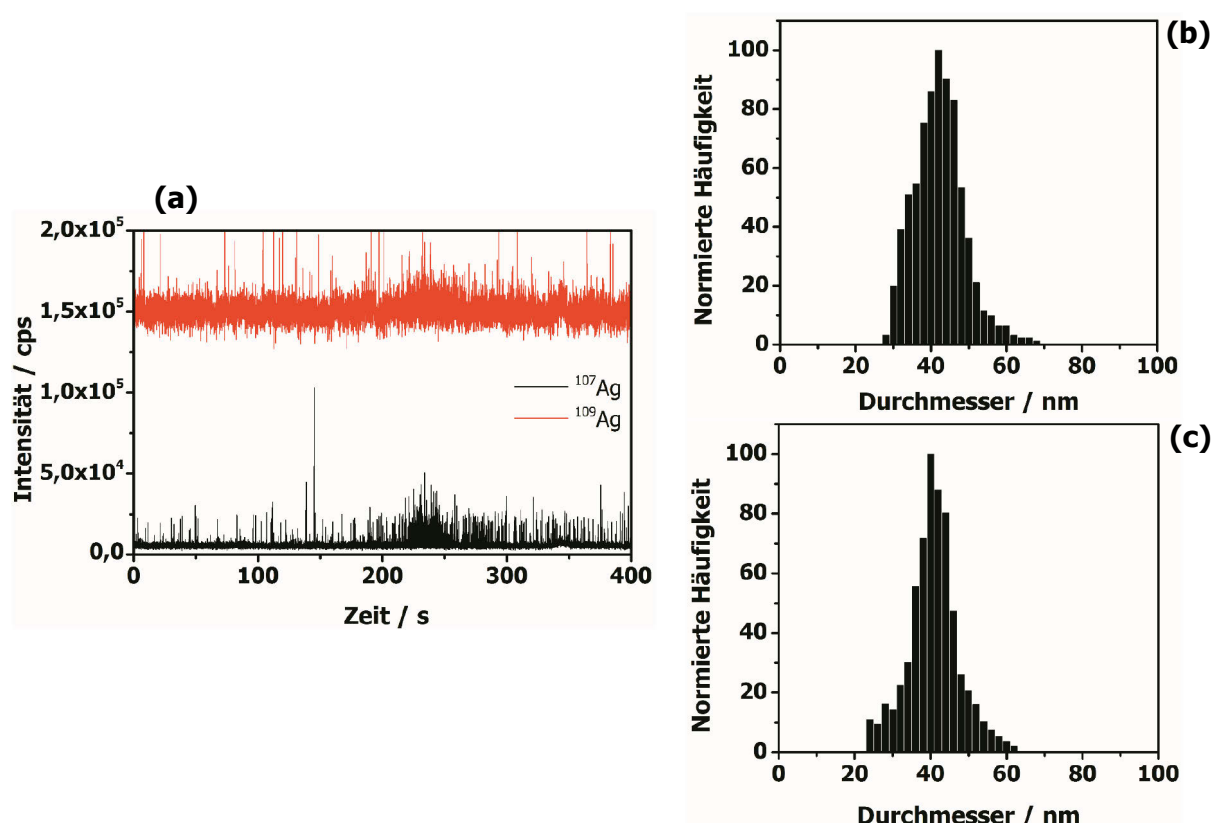


Abbildung 61: Logarithmische Auftragung des hydrodynamischen Durchmessers (DLS, intensitätsgewichtet, aus Tabelle 6) gegen das Retentionsvolumen für die 1000 Å- und 4000 Å-Säulen.

Während der Durchführung der Experimente wurde ebenfalls ein Anstieg des Säulendrucks beobachtet, welches auf eine langsame Sättigung der Säule mit größeren NP hindeutet. Nach einem Spülen mit Reinstwasser, gefolgt von 60% Acetonitril, konnte der ursprüngliche Säulendruck wiederhergestellt werden. Dies zeigt, dass die adsorbierten NP von der Säule gewaschen werden konnten.



Um die Ausschlussgrenze der 1000 Å-Säule zu bestimmen, wurden HPLC-ICP-MS-Experimente im EP-Modus in Kombination mit der IVA, wie bereits in Kapitel 5.6.5 beschrieben, durchgeführt. Dafür wurde die Probe NC40 ausgewählt, da diese niedrigen Wiederfindungsraten von nur 32% bei geringer Konzentration aufwies und in diesem Fall die Elution lediglich der kleineren Peakfraktion angenommen wurde. Dabei wurden sechs HPLC-IVA-EP-ICP-MS-Experimente der Probe NC40 durchgeführt und insgesamt 2634 NP detektiert. In Abbildungen 62 a-c sind beispielhaft eines dieser Chromatogramme (a), die entsprechende Partikelgrößenverteilung (b) und die Partikelgrößenverteilung mittels konventioneller EP-ICP-MS (c) gezeigt.



Abbildungen 62 a-c: HPLC-IVA-EP-ICP-MS-Chromatogramm (a) und die daraus resultierende Partikelgrößenverteilung (b) im Vergleich zu dem Histogramm der konventionellen EP-ICP-MS (c).

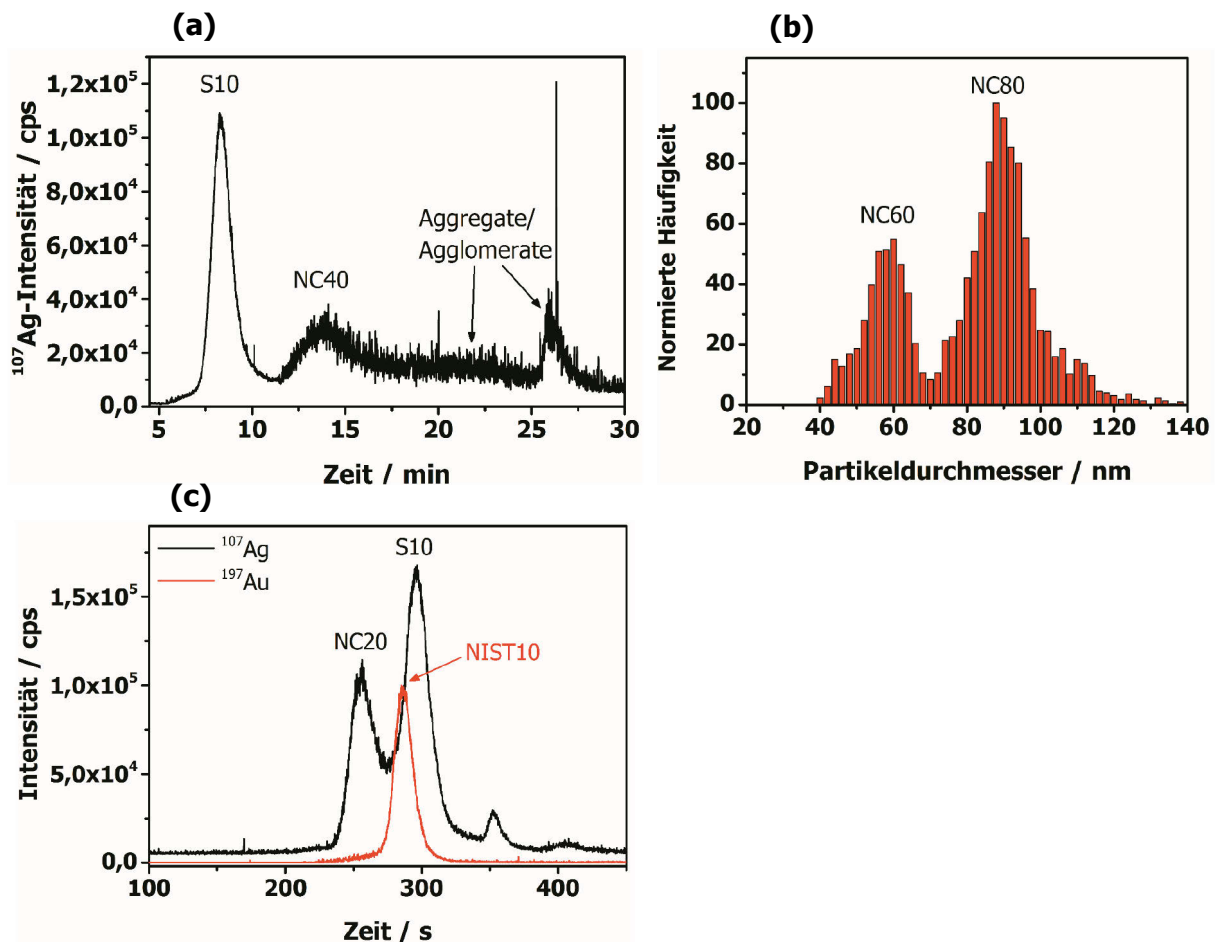
Ein Vergleich von Abbildungen 62 b und c ergibt eine nahezu identische Partikelgrößenverteilung mit ähnlichen mittleren Durchmessern von  $41 \pm 7$  nm (b) und dem zuvor beschriebenen Wert aus Tabelle 20 von  $40 \pm 8$  nm (c). [134] Dies deutet darauf hin, dass eine feste Ausschlussgrenze nicht existiert, was erneut die Annahme einer Interaktion der NP mit der stationären Phase unterstützt.

Trotz der in Abbildungen 62 b und c dargestellten, ähnlichen Ergebnisse hat die HPLC gegenüber der EP-ICP-MS den Vorteil einer höheren Auflösung. Darüber hinaus besitzt sie die Fähigkeit, Ionen und NP besonders im unteren NP-Größenbereich zu trennen und damit zuverlässigere Ergebnisse zur Bestimmung des Anteils an  $\text{Ag}^+$ -Ionen zu erzielen. [143]



## 5.8 Methodenvergleich

Aufgrund ihrer Vor- und Nachteile sollen die in den Kapiteln 5.4, 5.5, 5.6 und 5.7 entwickelten FFF-, EP-ICP-MS- und HPLC-Methoden zur Ag-NP-Charakterisierung im Folgenden miteinander verglichen werden. Als Beispiel sind in Abbildungen 63 a-c die Trennungen verschiedener Gemische aus Ag sowie Au-NP mittels HF-ICP-MS(a), EP-ICP-MS (b) und HPLC-ICP-MS (c) dargestellt.



Abbildungen 63 a-c: Vergleich der Trennungen, (a): HF5-ICP-MS-Fraktogramm der S10 ( $112,2 \mu\text{g L}^{-1}$ ) und NC40 Ag-NP ( $415,7 \text{ mg L}^{-1}$ ), (b): EP-ICP-MS-Histogramme der NC60 ( $5,9 \text{ ng L}^{-1}$ ) und NC80 Ag-NP ( $29,5 \text{ ng L}^{-1}$ ) und (c) HPLC-ICP-MS-Chromatogramm der Proben NC20 ( $20,2 \mu\text{g L}^{-1}$ ), S10 ( $33,6 \mu\text{g L}^{-1}$ ) und NIST10 ( $10,3 \mu\text{g L}^{-1}$ ) unter Verwendung der 1000 Å-Säule.

Die HF ist in der Lage, NP über den kompletten Größenbereich (1-100 nm) der NP-Definition zu trennen. Jedoch passieren die Teile des Analyten, die wie z.B.  $\text{Ag}^+$ -Ionen kleiner als die Porenausschlussgröße sind, die Poren und erreichen nicht den Detektor. Darüber hinaus kann es zur Bildung von Aggregaten/Agglomeraten kommen, wie aus Abbildung 63 a hervorgeht, und die Größe des hydrodynamischen Durchmessers kann lediglich abgeschätzt werden. Unter Verwendung der optimierten Methoden konnten die Proben S10 und NC40 in Abbildung 63 a basisliniengetreunt werden. Eine höhere Auflösung wäre mit einem konstanten QF erreichbar.

Insgesamt sind die FFF-Methoden die zeitintensivsten der drei betrachteten Verfahren (60 min [AF4] bzw. 30 min [HF5]). Mit der EP-ICP-MS kann man als einzige der drei Methoden die Partikelanzahl und die Partikelanzahlgrößenverteilung ermitteln. Zudem wird der Durchmesser des Ag-Kerns basierend auf der Annahme perfekt sphärischer NP berechnet. Der hydrodynamische Durchmesser kann nicht ermittelt werden. Eine gute Trennleistung konnte anhand der Basislinientrennung von NC60 und NC80 (Abbildung 63 b) erhalten werden. Jedoch liegt die NWG nur bei 7,2 nm (NC20, Tabelle 20, Kapitel 5.6.4), sodass nicht der komplette NP-Definitionsbereich abgedeckt werden kann. Allerdings ist eine Berechnung des Gehaltes an  $\text{Ag}^+$ -Ionen mit dieser Methode möglich, die jedoch durch die hohe Verdünnung sowie möglicherweise unzureichende Stabilisierung und daraus folgendes Auflösen der NP zu einem zu hohen Wert führen kann.

Mittels HPLC kann man Ionen von NP trennen. Partikel mit einem größeren Durchmesser als ca. 75 nm eluieren im Falle der 4000 Å-Säule nicht von der Säule. Damit kann nicht der komplette NP-Definitionsbereich getrennt werden. Besonders hoch ist die Trennleistung im unteren Größenbereich der 1000 Å-Säule, wie aus Abbildung 63 c für die Trennung der NC20, S10 und NIST10 NP erkennbar ist. Die erhaltenen  $\text{Ag}^+$ -Anteile stimmen gut mit den Werten der Ultrafiltration überein. Unter Verwendung der 4000 Å-Säule konnten zudem die höchsten Wiederfindungsraten der Ag-NP aller drei Methoden erhalten werden. Da sich die NIST60 NP nicht entsprechend der GPC-Theorie verhalten, war eine Größenbestimmung der Analyten mit diesen Standards nicht möglich. Weiterhin konnten in der HPLC NP-Durchmesser von bis zu ca. 56 nm (1000 Å) bzw. 74 nm (4000 Å) analysiert werden. Insgesamt betrachtet handelt es sich hierbei um die zeitsparendste Methode.

Der Methodenvergleich zeigt deutlich, dass eine Kombination mehrerer Methoden nötig ist, um alle relevanten Kenngrößen der NP, wie den hydrodynamischen und geometrischen Durchmesser, die Konzentration, die Partikelanzahlverteilung und den Gehalt an Ionen bestimmen zu können.

## 5.9 Interaktion von Huminstoffen mit Ag-NP

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten und optimierten HF5-ICP-MS-, HPLC-ICP-MS- und EP-ICP-MS-Methoden sollten im Folgenden angewandt werden, um das Umweltverhalten Citrat-stabilsierter Ag-NP zu untersuchen. Als vereinfachte Umweltmatrix wurde eine  $10 \text{ mg L}^{-1}$  HS-Lösung mit pH 7,5 gewählt, um oberflächennahes Wasser zu simulieren.

### 5.9.1 Hohlfaser-Fluss-Feldflussfraktionierung-ICP-MS

Mittels HF5 sollten Größenunterschiede, durch eine Anlagerung der HS auf der NP-Oberfläche sowie ein mögliches Aggregationsverhalten untersucht werden.

#### 5.9.1.1 Detektorauswahl für die Huminsäuren

Zusätzlich zur Information aus der HF5-Retentionszeit sollte eine direkte Detektion der HS überprüft werden, um deren Menge auf der NP-Oberfläche zu quantifizieren. Das ICP-MS ist dazu nicht in der Lage. Aus der Literatur ist jedoch bekannt, dass Huminstoffe Metalle komplexieren können. [173-175] Daher wurde untersucht, ob in der HS-Suspension metallische Verunreinigungen vorliegen, welche als Marker der HS verwendet werden können. Abbildung 64 stellt die zeitaufgelösten ICP-MS-Signalintensitäten einer  $10 \text{ mg L}^{-1}$  HS-Suspension dar.

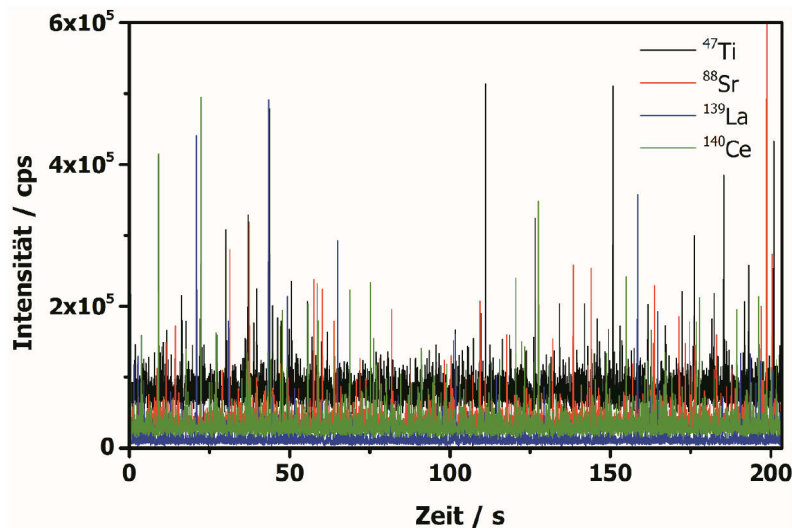


Abbildung 64: Zeitaufgelöste ICP-MS-Signalintensitäten der vier sequentiell gemessenen Isotope  $^{47}\text{Ti}$ ,  $^{88}\text{Sr}$ ,  $^{139}\text{La}$  und  $^{140}\text{Ce}$  für die  $10 \text{ mg L}^{-1}$  HS-Suspension.

Abbildung 64 weist viele einzelne, hohe Spikes auf, die auf das Vorhandensein von NP hindeuten. In der Literatur ist ebenfalls beschrieben, dass HS in Gegenwart von Metallsalzen zu NP agglomerieren können. [44, 48, 176] Zur Überprüfung der Anwesenheit von NP wurde ein HF5-ICP-MS-Fraktogramm aufgezeichnet, welches in Abbildung 65 wiedergegeben ist.

Das Fraktogramm in Abbildung 65 zeigt ebenfalls Signale, die den Spikes des EP-ICP-MS-Modus entsprechen und bestätigt mit der Elution bei einer Retentionszeit von 15-23 min die Vermutung des Vorhandenseins von NP in der HS-Suspension. Anhand einer Kalibrierung aus NIST Au-NP kann ein hydrodynamischer Durchmesser zwischen etwa 65 nm (15 min) und 130 nm (23 min) abgeschätzt werden. Mittels DLS wurde ein Durchmesser von 183 nm mit einer Peakbreite von 74 nm (siehe Tabelle 6, Kapitel 5.3) detektiert. Da größere Partikel mit einer höheren Intensität streuen als kleinere Partikel, kommt es in der DLS zu einer Verschiebung zu größeren Durchmessern. Einige Signale mit größeren Durchmessern von etwa 160-175 nm und einer Retentionszeit von ca. 27-29 min sind im HF5-Fraktogramm in Abbildung 65 erkennbar.

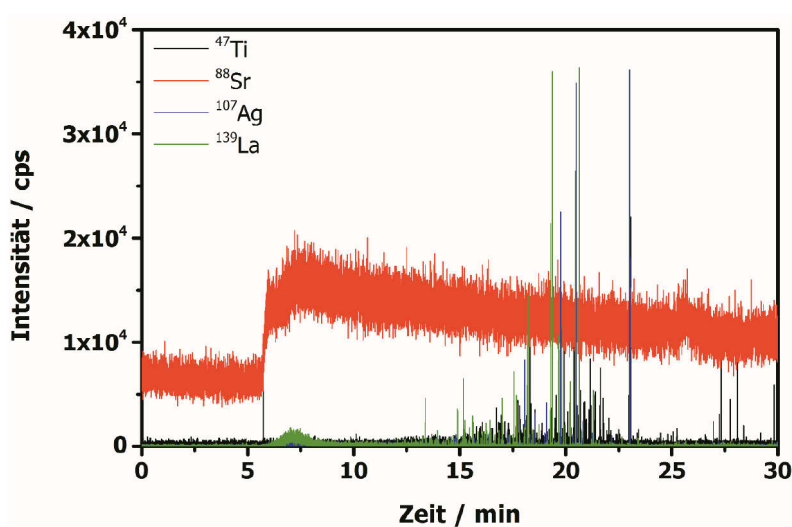


Abbildung 65: HF5-ICP-MS-Fraktogramm einer 10 mg L<sup>-1</sup> HS-Suspension.

Da die untersuchten Elemente somit nicht als HS-komplexierte Metallionen vorliegen, ist ihre Verwendung als Marker für potentielle HS-Ablagerungen auf der Ag-NP-Oberfläche nicht möglich. Daher wurde im nächsten Schritt die Detektion der HS mittels UV/Vis-Spektroskopie in Abbildung 66 untersucht. Diese verdeutlicht, dass eine ausschließliche Detektion der HS ohne zusätzliche Signale der NP oder ihrer Citrat-Beschichtung nicht möglich ist. Um diese Interferenzen zu minimieren, sollte eine Fluoreszenz-Detektion überprüft werden. Abbildung 67 a stellt die Fluoreszenzspektren von HS, NC20 NP und einer Mischung beider Substanzen dar. Zur Ermittlung der Anregungs- und Emissionswellenlängen mit der höchsten Intensität für die HS-Suspension wurde eine 2D-Fluoreszenzkarte aufgezeichnet (Abbildung 67 b). Aus diesen Abbildungen geht hervor, dass eine Detektion der HS offensichtlich ohne Interferenzen durch die NP möglich ist. Da die Anregungs- und Emissionswellenlänge bei 350 nm und 470 nm die höchste Intensität aufweisen, wurden diese im Folgenden für die *on-line* Kopplung der HF5 mit einem Fluoreszenz-Detektor verwendet. Dabei zeigte sich jedoch, dass das Signal einer injizierten Suspension mit einer Konzentration von 10 mg L<sup>-1</sup> HS mit einer überbrückten HF

unterhalb der Nachweisgrenze lag. Somit konnte die Fluoreszenz-Detektion zumindest nicht in Kombination mit der HF eingesetzt werden.

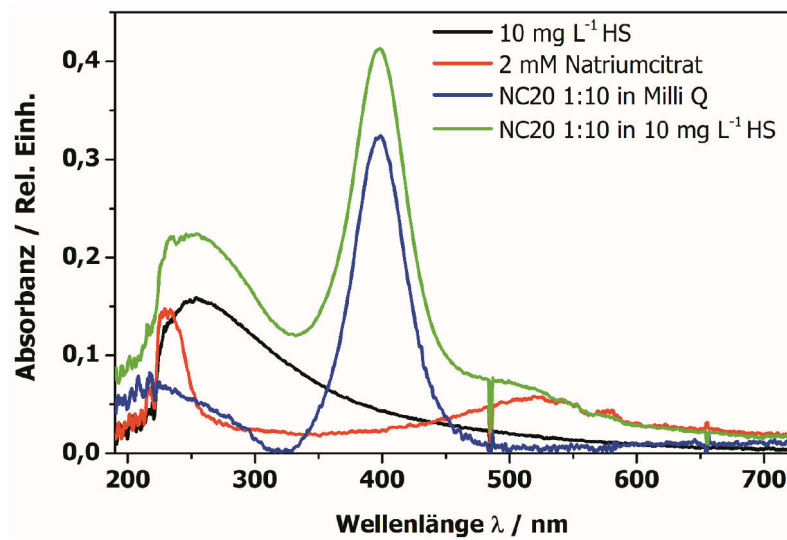
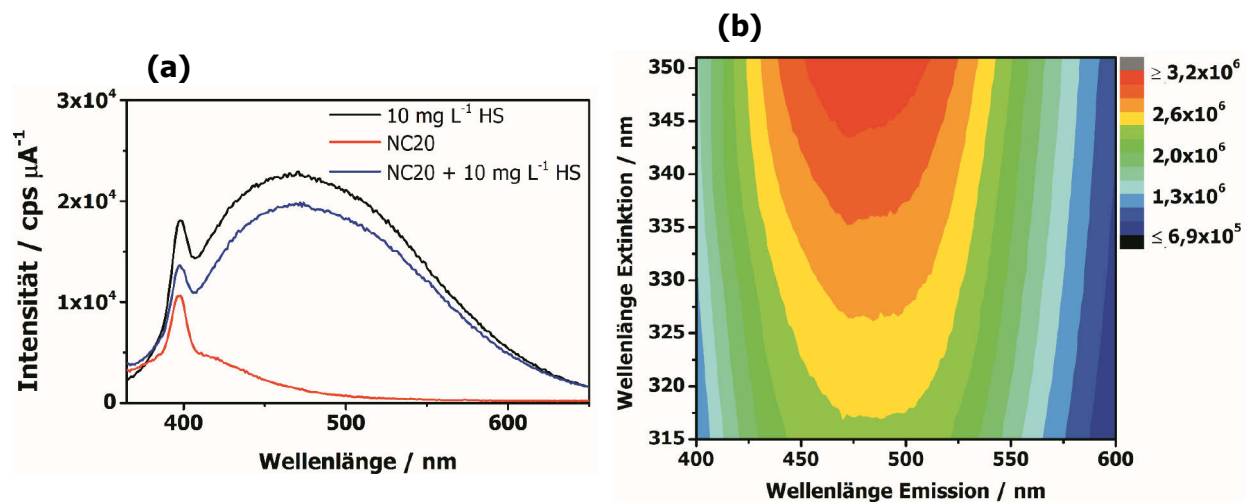


Abbildung 66: UV/Vis-Spektren von einer 10 mg L<sup>-1</sup> HS-Suspension und 2 mM Natriumcitrat sowie der Probe NC20 mit und ohne Zugabe von HS.



Abbildungen 67 a und b: Fluoreszenzemissionsspektren für die HS-Suspension sowie die NC20 Ag-NP mit und ohne HS-Zugabe, Extinktionswellenlänge 350 nm (a) sowie eine 2D-Fluoreszenzkarte der HS-Suspension (b).

#### 5.9.1.2 Zeitabhängiger Einfluss der Huminsäuren auf die Ag-NP

Da mittels UV/Vis- und Fluoreszenz-Detektion kein direkter Nachweis der HS möglich war, wurde im Folgenden lediglich der zeitliche Einfluss der HS-Zugabe auf die Fraktogramme der beiden NP-Systeme S10 und NC60 untersucht. Diese sind in Abbildungen 68 (S10) und 69 (NC60) dargestellt.

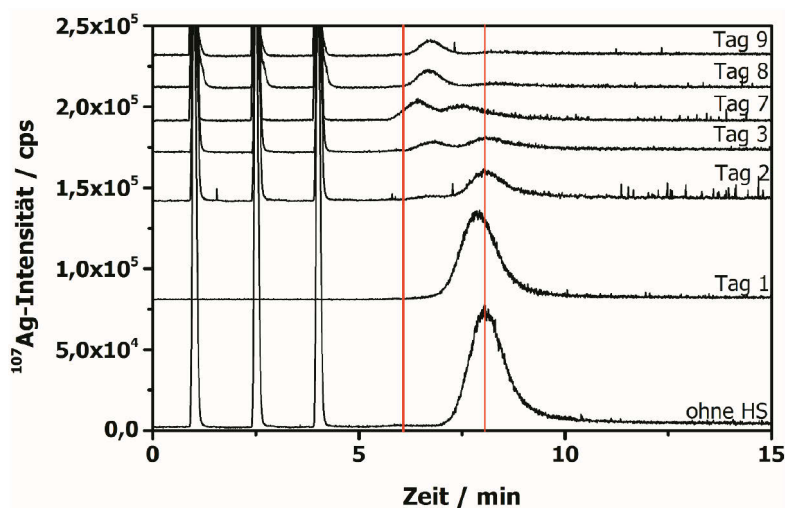


Abbildung 68:  $^{107}\text{Ag}$ -Fraktogramme der Probe S10 mit HS-Zugabe in Abhängigkeit der Zeit.

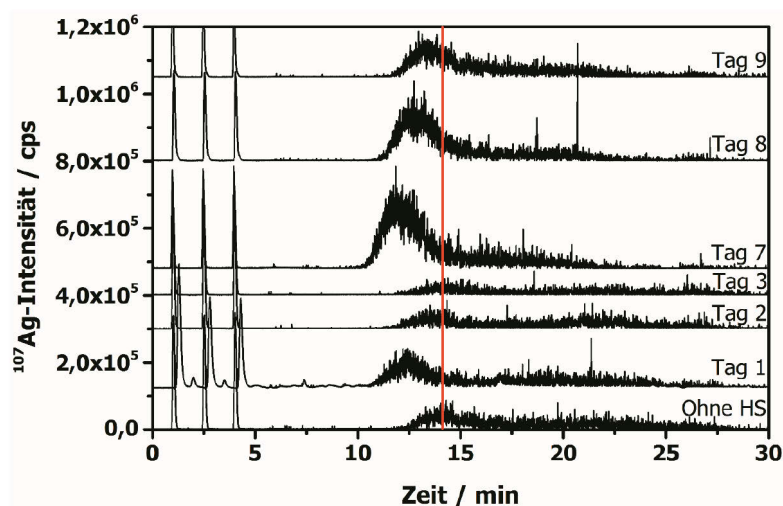


Abbildung 69:  $^{107}\text{Ag}$ -Fraktogramme der Probe NC60 mit HS-Zugabe in Abhängigkeit der Zeit.

Für die S10 NP ist bereits ab Tag 2 eine stark abnehmende Peakintensität zu erkennen. Zudem zeigen diese NP ab Tag 3 auch die Entstehung eines zweiten Peaks bei kleineren Retentionszeiten. Der Peak bei ca. 7 min deutet darauf hin, dass möglicherweise neue NP aus den  $\text{Ag}^+$ -Ionen geformt werden [44, 48, 177] oder eine starke Komplexierung der  $\text{Ag}^+$ -Ionen erfolgt. Für die NC60 NP hingegen konnten diese beiden Effekte nicht nachgewiesen werden. Diese zeigten jedoch unregelmäßig verschobene Peakmaxima, was u.a. an der Veränderung der Membranoberfläche durch deren Alterung und zusätzlich durch den Wechsel der HF am Tag 7 liegen kann. Darauf deuten auch die ermittelten Wiederfindungsraten hin, die in Abbildung 70 dargestellt sind und eine deutlich Änderung zwischen Tag 3 und 7 aufweisen. Den Einfluss der HS auf die erhaltenen NP-Größen gibt Tabelle 28 wieder. Aus dieser ist für die S10 NP ab Tag 3 ein zweiter Peak mit einer Größe zwischen 2-9 nm deutlich zu erkennen. Die Ursache dafür ist bislang nicht geklärt. Dabei können NP-Wachstum oder, wie auch für die S10 und NC60 NP

gezeigt, die HF-Alterung und die damit verbundene veränderte Membran-NP-Interaktion eine Rolle spielen.

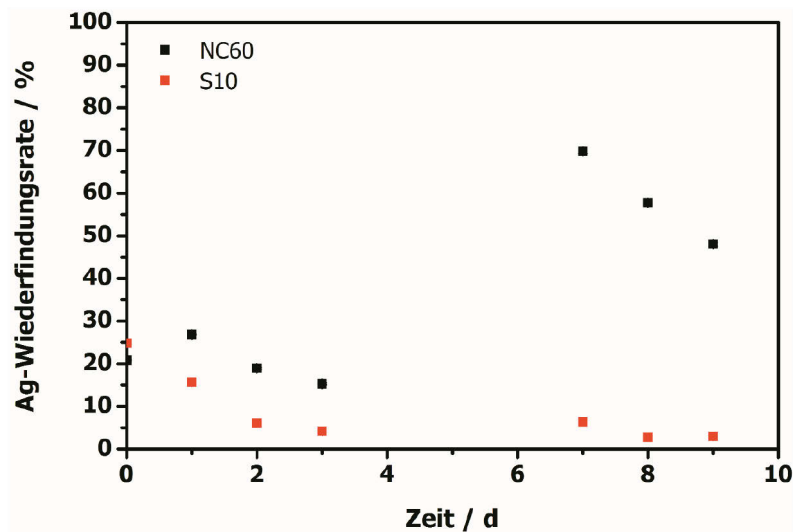


Abbildung 70: Zeitlich abhängige Wiederfindungsraten der Proben S10 und NC60 in einer HS-Suspension mittels HF5-ICP-MS.

Tabelle 28: Ermittelte Partikeldurchmesser in der HS-Suspension; Größenbestimmung mittels externer Kalibration mit NIST Au-NP und polynomischer Funktion zweiten Grades.

Zeitpunkt	S10 / nm	NC60 / nm
ohne HS	14,2	89,0
Tag 1	12,5	71,4
Tag 2	13,3	90,6
Tag 3	2,4; 14,4	105,0
Tag 7	5,2; 12,9	70,5
Tag 8	9,3; 16,2	70,5
Tag 9	6,9; 13,4	72,6

### 5.9.2 Einzelpartikel-ICP-MS

Wie zuvor gezeigt, wurde die Entstehung eines zweiten, kleineren NP-Peaks für die S10 NP mittels HF5-ICP-MS nachgewiesen. Da allerdings nicht geklärt werden konnte, ob die gemittelten Durchmesser durch eine veränderte Membran-NP-Interaktion verursacht sind und/oder eine tatsächliche Größenänderung darstellen sowie keine Aussage über den Gehalt an Ionen getroffen werden konnte, wurde im Folgenden die Eignung der EP-ICP-MS für diese Systeme untersucht.

Hierfür wurden zeitabhängige Messungen des Verhaltens von NC30 und NC60 Ag-NP in 1 mg L<sup>-1</sup> HS sowie zum Vergleich in Reinstwasser (ohne HS) durchgeführt. Die ermittelten NP-Durchmesser, Ag-Konzentrationen, Partikelanzahlen und Untergrundsignale fassen Tabellen

29 (NC30) und 30 (NC60) zusammen. Ein Vergleich der NP-Anzahl und der Ag-NP-Konzentration der NC30 und NC60 NP in Tabellen 29 und 30 zeigen, dass die HS-Suspension die NP deutlich besser stabilisiert als Reinstwasser. In der HS-Suspension konnte eine leicht sinkende Ag-NP-Konzentration sowie ein geringer Anstieg der  $\text{Ag}^+$ -Konzentration detektiert werden. Letzteres kann sowohl auf eine gute Stabilisierung der  $\text{Ag}^+$ -Ionen in HS als auch auf ein geringes Auflösen der NP in diesem Medium hindeuten. Dabei lagen die Gesamtwiederfindungsraten der NP und der  $\text{Ag}^+$ -Ionen durch eine hohe, beobachtete Zirkonium-Kontamination der HS-Suspension zusammen über 100%. Im Gegensatz dazu nahmen die Ag-NP- und  $\text{Ag}^+$ -Konzentrationen in Reinstwasser signifikant ab. Darüber hinaus ist aus Tabellen 29 und 30 lediglich ein vernachlässigbarer Einfluss beider Eluenten auf den geometrischen Durchmesser zu erkennen.

Tabelle 29: Zeitabhängige Veränderungen des Partikeldurchmessers, der Partikelanzahl sowie der Ag-NP und  $\text{Ag}^+$ -Konzentration in HS und Reinstwasser für die NC30 NP.

Tag	10 mg L <sup>-1</sup> HS				Reinstwasser			
	Durchmesser / nm	NP-Anzahl	Ag-NP / mg L <sup>-1</sup>	$\text{Ag}^+$ / mg L <sup>-1</sup>	Durchmesser / nm	NP-Anzahl	Ag-NP / mg L <sup>-1</sup>	$\text{Ag}^+$ / mg L <sup>-1</sup>
1	35 ± 8	6,0x10 <sup>13</sup>	15,70	14,31	34 ± 6	6,6x10 <sup>13</sup>	14,42	7,85
6	33 ± 8	5,7x10 <sup>13</sup>	13,16	15,39	27 ± 8	3,3x10 <sup>13</sup>	5,04	6,10
7	32 ± 7	5,5x10 <sup>13</sup>	12,15	16,09	27 ± 8	2,7x10 <sup>13</sup>	3,95	6,32
14	30 ± 8	5,3x10 <sup>13</sup>	10,19	18,94	28 ± 7	1,4x10 <sup>13</sup>	2,12	1,73

Tabelle 30: Zeitabhängige Veränderungen des Partikeldurchmessers, der Partikelanzahl sowie der Ag-NP und  $\text{Ag}^+$ -Konzentration in HS und Reinstwasser für die NC60 NP.

Tag	10 mg L <sup>-1</sup> HS				Reinstwasser			
	Durchmesser / nm	NP-Anzahl	Ag-NP / mg L <sup>-1</sup>	$\text{Ag}^+$ / mg L <sup>-1</sup>	Durchmesser / nm	NP-Anzahl	Ag-NP / mg L <sup>-1</sup>	$\text{Ag}^+$ / mg L <sup>-1</sup>
1	65,2 ± 9,0	1,2x10 <sup>13</sup>	18,65	3,95	65,2 ± 9,0	1,3x10 <sup>13</sup>	19,38	2,81
6	63,6 ± 8,7	1,2x10 <sup>13</sup>	16,92	4,48	63,0 ± 8,7	8,6x10 <sup>12</sup>	11,95	1,11
7	63,3 ± 9,5	1,2x10 <sup>13</sup>	17,17	4,78	62,8 ± 8,2	7,4x10 <sup>12</sup>	10,28	1,49
14	62,8 ± 8,7	1,1x10 <sup>13</sup>	16,23	6,28	62,7 ± 8,4	4,8x10 <sup>12</sup>	6,68	0,69

### 5.9.3 Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Um die bereits mittels HF beobachtete Bildung eines zweiten NP-Peaks für die S10 NP zu überprüfen, wurden HPLC-IVA-ICP-MS-Analysen dieser NP durchgeführt.

Der zeitabhängige Einfluss der HS auf die S10 NP wurde für vier aufeinander folgende Experimente untersucht und ist in Abbildung 71 dargestellt. Wie zu erkennen ist, nimmt die



Intensität des Peaks bei 290 s stark ab, während gleichzeitig ein Anstieg des Peaks, der den  $\text{Ag}^+$ -Ionen zugeordnet werden kann, beobachtet wird. Nach 21 min wurde ein Anteil an  $\text{Ag}^+$ -Ionen von 61,4% gefunden, im Gegensatz zu den 6,5% ohne HS-Zugabe (siehe Abbildung 60 a, Kapitel 5.7.3). Dieser hohe Wert könnte sowohl von der hohen Zr-Kontamination der HS-Suspension als auch durch das Auflösen der NP stammen. Zudem ist ab Messung 2 eine kleine Schulter vor dem  $\text{Ag}^+$ -Ionen-Peak bei einer Retentionszeit von ca. 330 s zu erkennen. Dies könnte auf das Vorhandensein von kleineren NP oder  $\text{Ag}^+$ -HS Aggregaten, wie bereits mittels HF in Kapitel 5.8.1.2 beschrieben, hindeuten.

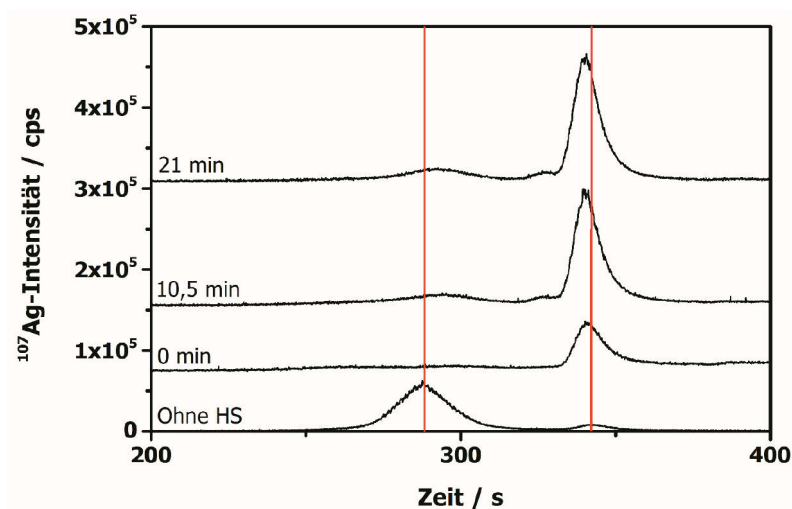


Abbildung 71: HPLC-ICP-MS-Chromatogramm der Probe S10 ohne HS-Zugabe sowie die zeitlich abhängigen Veränderungen mit  $10 \text{ mg L}^{-1}$  HS (1000 Å-Säule).

Alle drei untersuchten Verfahren (HF-ICP-MS, EP-ICP-MS und HPLC-IVA-ICP-MS) zeigen somit deutlich, dass von einem Einfluss der HS auf die Ag-NP und die  $\text{Ag}^+$ -Ionen ausgegangen werden muss. Der genaue Mechanismus dieser Veränderungen konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht aufgeklärt werden. Dazu werden weitere Untersuchungen benötigt. Im Rahmen dieser Arbeit war eine direkte Detektion der HS nicht möglich. Erst wenn dieses gelingt, z.B. mittels Lanthanoid-, Isotopenmarkierung oder empfindlicher Fluoreszenzdetektion die HS direkt zu detektieren, könnte ermittelt werden, an welche HS-Fraktion sich die  $\text{Ag}^+$ -Ionen anlagern können. Eine Metallmarkierung könnte zudem eine Quantifizierung des HS-Gehaltes auf der Ag-NP-Oberfläche ermöglichen.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden erfolgreich vier unterschiedliche Methoden zur Charakterisierung, Trennung, Identifizierung und Quantifizierung von Silber-Nanopartikeln (Ag-NP) entwickelt und miteinander verglichen. Dabei lag der Fokus der Untersuchungen auf Partikelgröße und -konzentration.

Die Untersuchungen begannen mit der Optimierung einer asymmetrischen Fluss-Feldfluss-fraktionierung(AF4)-Methode mit dem Ziel, hohe Auflösungen und Wiederfindungsraten zu erzielen und gleichzeitig die Bildung von Aggregaten zu vermeiden. Dazu mussten verschiedene Parameter, wie die Fokussierungszeit (FZ), das Injektionsvolumen, der Querfluss(QF)-Gradient, das Membranmaterial, der Eluent und die Art des Detektors optimiert werden. Mittels AF4 und induktiv gekoppeltem Plasma-Massenspektrometer (ICP-MS) konnten hohe Wiederfindungsraten von 90% realisiert werden. Die während der Methodenoptimierung durchgeführte, systematische Untersuchung von Verlusten zeigte, dass Verluste durch den QF und Strömungsteilerfluss sowie durch Aggregate für die hier entwickelte Methode und das untersuchte NP-System vernachlässigbar waren. Geringe Ablagerungen konnten im AF4-System durch die Überbrückung des Kanals festgestellt werden. Mittels Laserablation-ICP-MS wurden erstmals geringe Ag-Rückstände auf der Membran in der Nähe der Probeninjektion und am Rand des vorderen Teils nachgewiesen. Den größten Einfluss auf die Wiederfindungsrate hatten für die Ag-NP die  $\text{Ag}^+$ -Ionen, welche immer zu einem Teil in Ag-NP-Proben vorhanden sind, die durch die Poren der Membran nahezu vollständig verloren gehen. Mittels einer externen Kalibrierung konnte der NP hydrodynamische Durchmesser abgeschätzt werden, welcher gut mit dem geometrischen Durchmesser (Transmissionselektronenmikroskopie) und dem zertifizierten Trägheitsdurchmesser übereinstimmte.

Da eine Trennung der Citrat-stabilisierten Ag-NP mittels AF4 im Rahmen dieser Arbeit aufgrund einer starken Aggregation nicht möglich war, wurde eine Hohlfaser-Fluss-Feldfluss-fraktionierung-ICP-MS-Methode entwickelt. Hierbei wurden der Eluent, der Gradient und die FZ optimiert sowie drei verschiedene HF miteinander verglichen. Die optimierte Methode zeigt dabei eine gute Trennung der NP mit nominellen Größen zwischen 10-80 nm. Ein Vergleich mit den Werten der dynamischen Lichtstreuung zeigt für die meisten Werte eine gute Übereinstimmung. Die Wiederfindungsraten lagen jedoch lediglich zwischen ca. 13-73%. Der größte Vorteil der HF gegenüber der AF4 ist die deutliche Verkürzung der Analysenzeit von 60 min auf 30 min. Im Gegensatz dazu hat eine HF eine deutlich kürzere Lebenszeit als eine AF4-Membran.

Für das dritte Verfahren der Einzelpartikel (EP)-ICP-MS wurde zunächst die Probenvorbereitung optimiert. Dazu wurden Verdünnungen in verschiedenen Eluenten hinsichtlich Partikelanzahl und -größe untersucht. Es stellte sich heraus, dass Reinstwasser im Vergleich zu Natrium- oder Ammoniumcitratlösungen den höchsten Kalibrierfaktor und somit die höchste Empfindlichkeit aufwies. Anschließend wurden drei verschiedene Methoden zur Bestimmung der Transporteffizienz miteinander verglichen. Die Ergebnisse zeigten, dass die Methode der Bestimmung der Partikelanzahl als Einzige mögliche Partikelverluste in den Probengefäßen berücksichtigte. Die optimale Partikelanzahl und Integrationszeit der EP-ICP-MS konnte ermittelt werden. Für die optimierte Methode wurden Nachweisgrenzen, Gehalte an Ionen und Wiederfindungsraten bestimmt. Die dabei berechneten geometrischen Durchmesser stimmen mit den Herstellerangaben, die mittels TEM ermittelt wurden, überein.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode zeichnet sich durch ihre einfache Handhabbarkeit, hohe Auflösung bzgl. Partikelanzahl und -größenverteilung sowie die Bestimmbarkeit des Gehaltes an Ionen aus. Zur Bestimmung der Größe der Nanopartikel in komplexeren Matrizen wurde die Isotopenverdünnungsanalyse (IVA) mit der EP-ICP-Quadrupol-MS kombiniert. Hierbei werden die beiden Ag-Isotope sequentiell gemessen und die NP-Anzahl und -Masse lediglich auf dem abgereicherten  $^{107}\text{Ag}$ -Isotop detektiert. Zur Ermittlung des Massenflusses aus den Signalintensitäten mussten das Isotopenverhältnis vereinfacht und die speziesunspezifische IVA-Gleichung um die Transporteffizienz ergänzt werden. Durch die Integration der NP-Signale und Multiplikation mit der Integrationszeit konnten so die Massen jedes einzelnen NPs direkt ermittelt werden. Ein Vergleich des IVA-Ansatzes unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen des IVA-Standards mit dem konventionellen EP-ICP-MS-Ansatz zeigte vergleichbare Ergebnisse. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die ermittelte NP-Größe möglicherweise unabhängig von der Konzentration des IVA-Standards ist. Dabei wurden vergleichbare Ergebnisse sowohl für den Ansatz mit Matrixzugabe als auch den konventionellen Ansatz ohne Matrix erhalten. Somit ist es möglich, den Durchmesser und die Partikelanzahl von Ag-NP in jeglicher Matrix ohne vorherige Kenntnisse über ihre Größe zuverlässig zu bestimmen. Allerdings ist diese Methode nicht für monoisotope Elemente (z.B. Al in  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) anwendbar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zuerst der Eluent einer Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)-Methode optimiert. Im Gegensatz zur publizierten HPLC-Trennung konnte die Auflösung der Nanopartikel durch Substitution des Natriumthiosulfats durch Penicillamin unter gleichzeitiger Stabilisierung der  $\text{Ag}^+$ -Ionen verhindert werden. Die Quantifizierung erfolgte durch die IVA. Anschließend wurde die Trennleistung zweier Säulen mit unterschiedlichen Porengrößen verglichen. Mit der 1000 Å-Säule konnte eine Basislinientrennung von NP mit einem nominellen Durchmesser von 10 nm und  $\text{Ag}^+$ -Ionen erhalten werden. Dabei eluierten

Partikel bis zu einem nominellen Durchmesser von 50 nm. Im Gegensatz dazu zeigte die 4000 Å-Säule eine geringere Auflösung im unteren Größenbereich, konnte jedoch NP bis zu einer nominellen Größe von 60 nm trennen. Die Methode konnte für beide Säulen erfolgreich für die Trennung von Ag, Au und Polystyrol NP angewandt werden. Die Bestimmung des Gehalts an Ag<sup>+</sup>-Ionen ergab vergleichbare Werte zur Ultrafiltration. Für die 4000 Å-Säulen konnten hohe Wiederfindungsraten für NP bis zu einem nominellen Durchmesser von 40 nm erhalten werden. Die Wiederfindungsraten der 1000 Å-Säule sanken mit steigender NP-Größe. Partikel mit einem nominellen Durchmesser von über 60 nm verblieben auf der Säule. Als Trennmechanismus wird daher eine Kombination des Größenausschlusschromatographie-Mechanismus und von Wechselwirkungen der NP mit der stationären Phase postuliert. Die entwickelte HPLC-Methode erzielt die höchsten Wiederfindungsraten innerhalb der kürzesten Analysenzeit. Jedoch ist eine Größenbestimmung, aufgrund fehlender Standards und der Interaktionen größerer NP mit der stationären Phase, bisher nicht möglich.

Die entwickelten HF5-ICP-MS-, EP-ICP-MS- und HPLC-ICP-MS-Methoden wurden zur Untersuchung des Verhaltens von Ag-NP in einer synthetischen Huminstoff-Matrix angewendet. Dabei konnten deutliche Veränderungen besonders für kleinere Nanopartikel beobachtet werden. So konnte für kleine NP mittels HF5 und HPLC die Bildung neuer, noch kleinerer NP mit einer Größe von zwischen ca. 2-9 nm detektiert werden. Die EP-ICP-MS-Analysen zeigten, dass die untersuchten Nanopartikel deutlich besser in Huminstoffen als in Reinstwasser stabilisiert werden. Dabei konnte keine signifikante Größenänderung der untersuchten Analyssysteme beobachtet werden.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass keine der vier optimierten Methoden in der Lage ist, relevante Eigenschaften eines NP-Systems, wie Größe (hydrodynamisch und geometrisch), Konzentration und Gehalt an Ionen, allein zu bestimmen. Dieses kann nur mit einer Kombination mehrerer Methoden erfolgen.

In zukünftigen Arbeiten könnten die entwickelten Methoden für weitere umweltrelevante NP-Systeme, wie z.B. Titandioxid, Zinkoxid oder Ceroxid, angewendet und modifiziert werden. Damit wäre die Analyse anderer komplexer Proben wie Kosmetika oder natürlicher Gewässer möglich. Besonders gut eignet sich hierfür die IVA-EP-ICP-MS-Methode.

Da die Ursache der Probenverluste in der FFF nur zum Teil aufgeklärt werden konnte, sind weitere Untersuchungen für andere NP-Systeme von hohem wissenschaftlichem Interesse. Dabei wäre besonders die Aufklärung eines möglichen Zusammenhanges zwischen der Wiederfindungsrate und dem Rückstand auf der Membran bzw. in der Fritte von Bedeutung.

Mittels IVA-EP-ICP-MS wurde eine stärkere Beeinträchtigung des NP-Signals, im Gegensatz zu dem Signal des IVA-Standards, durch die Matrix beobachtet. Dies kann zu Fehlern in der Größenbestimmung führen. Zum besseren Verständnis sollte der unterschiedliche Einfluss

der Matrix auf die NP und den IVA-Standard weiter aufgeklärt werden. Zudem wurden unterschiedliche Transporteffizienzen mit und ohne Matrix ermittelt. Somit sollte die Bestimmung einer Matrix-angepassten Transporteffizienz überprüft werden.

Weiterhin wäre eine Studie mit dem Fokus auf die Kinetik und Aufklärung des Bildungsmechanismus zusätzlicher Peaks (HPLC und HF5) für die Untersuchung von Nanopartikeln in Huminstoffmatrizes von Interesse. Darüber hinaus sollten die längerfristige Interaktion von NP mit HS und das Verhalten in komplexeren Gewässerproben aufgeklärt werden.

Mit den hier entwickelten Methoden ist eine Unterscheidung von anthropogenen und geogenen NP im Oberflächengewässern nicht möglich, da es mit der hier eingesetzten nachweisstärksten Methode, der EP-ICP-MS, nicht möglich ist, mehr als ein Isotop pro Integrationszeitraum zu analysieren. Erst die Korrelation mit anderen, natürlich vorkommenden oder künstlich dotierten Elementen könnte zur Unterscheidung genutzt werden. Hier wäre die Anwendung von simultanen ICP-MS-Geräten wie der ICP-Flugzeit-MS oder ein doppeltfokussierendes Sektorfeld-MS mit Mattauch-Herzog-Geometrie und simultanem Detektor vielversprechend. Damit könnten auch aktuell in Konsumgütern eingesetzte NP-Multikomponentensysteme nachgewiesen werden.

Alle hier eingesetzten Trennverfahren waren zudem nicht in der Lage, Oberflächenbeschichtungen zu unterscheiden, von denen eine Vielzahl in unterschiedlichen Produkten eingesetzt wird. Hier wären Trenntechniken bzw. multidimensionale oder gekoppelte Systeme zu entwickeln. So bleibt auch in Zukunft die Entwicklung von analytischen Methoden zur Charakterisierung von modernen NP-Systemen eine spannende Herausforderung.

## 7 Literatur

1. Ozin GA, Arsenault AC, Cademartiri L, Chemistry RSo. Nanochemistry: a chemical approach to nanomaterials. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2009.
2. Sengupta A, Sarkar CK. Introduction to nano: basics to nanoscience and nanotechnology. Berlin Heidelberg: Springer; 2015.
3. Schmid G. Nanotechnology: principles and fundamentals. Weinheim: Wiley-VCH; 2008.
4. Empfehlung der Europäischen Kommission vom 18. Oktober 2011 zur Definition von Nanomaterialien, (2011/696/EU).
5. Verordnung (EU) Nr. 1169/2011 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 25. Oktober 2011 betreffend die Information der Verbraucher über Lebensmittel, (2011/1169/EU).
6. Verordnung (EU) Nr. 10/2011 der Europäischen Kommission vom 14. Januar 2011 über Materialien und Gegenstände aus Kunststoff, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen, (2011/10/EU).
7. Verordnung (EG) Nr. 1223/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 30. November 2009 über kosmetische Mittel, (2009/1223/EG).
8. Verordnung (EU) Nr. 528/2012 des Europäischen Parlaments und des Rates. über die Bereitstellung auf dem Markt und die Verwendung von Biozidprodukten. vom 22. Mai 2012.
9. Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 18. Dezember 2006 zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH), (2006/1097/EG).
10. Sotebier CA, Bierkandt FS, Rades S, Jakubowski N, Panne U, Weidner SM. Sample loss in asymmetric flow field-flow fractionation coupled to inductively coupled plasma-mass spectrometry of silver nanoparticles. J Anal Atom Spectrom. 2015;30(10):2214-22.
11. Tiede K, Boxall ABA, Tear SP, Lewis J, David H, Hassellöv M. Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment. Food Additives & Contaminants: Part A. 2008;25(7):795-821.
12. Tiede K, Tear SP, David H, Boxall ABA. Imaging of engineered nanoparticles and their aggregates under fully liquid conditions in environmental matrices. Water Research. 2009;43(13):3335-43.
13. Pabisch S, Feichtenschlager B, Kickelbick G, Peterlik H. Effect of interparticle interactions on size determination of zirconia and silica based systems – A comparison of SAXS, DLS, BET, XRD and TEM. Chemical Physics Letters. 2012;521(0):91-7.
14. Fedotov PS, Vanifatova NG, Shkinev VM, Spivakov BY. Fractionation and characterization of nano- and microparticles in liquid media. Anal Bioanal Chem. 2011;400(6):1787-804.

15. Hassellöv M, Readman JW, Ranville JF, Tiede K. Nanoparticle analysis and characterization methodologies in environmental risk assessment of engineered nanoparticles. *Ecotoxicology*. 2008;17(5):344-61.
16. Gigault J, Cho TJ, MacCuspie RI, Hackley VA. Gold nanorod separation and characterization by asymmetric-flow field flow fractionation with UV-Vis detection. *Anal Bioanal Chem*. 2013;405(4):1191-202. Epub 2012/11/16.
17. Kim ST, Kim HK, Han SH, Jung EC, Lee S. Determination of size distribution of colloidal TiO<sub>2</sub> nanoparticles using sedimentation field-flow fractionation combined with single particle mode of inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Microchem J*. 2013;110(0):636-42.
18. Loeschner K, Navratilova J, Legros S, Wagner S, Grombe R, Snell J, et al. Optimization and evaluation of asymmetric flow field-flow fractionation of silver nanoparticles. *J Chromatogr A*. 2013;1272:116-25.
19. Gray EP, Bruton TA, Higgins CP, Halden RU, Westerhoff P, Ranville JF. Analysis of gold nanoparticle mixtures: a comparison of hydrodynamic chromatography (HDC) and asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4) coupled to ICP-MS. *J Anal Atom Spectrom*. 2012;27(9):1532-9.
20. Pergantis SA, Jones-Lepp TL, Heithmar EM. Hydrodynamic Chromatography Online with Single Particle-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry for Ultratrace Detection of Metal-Containing Nanoparticles. *Anal Chem*. 2012;84(15):6454-62.
21. Proulx K, Wilkinson KJ. Separation, detection and characterisation of engineered nanoparticles in natural waters using hydrodynamic chromatography and multi-method detection (light scattering, analytical ultracentrifugation and single particle ICP-MS). *Environ Chem*. 2014;11(4):392-401.
22. Hanley TA, Saadawi R, Zhang P, Caruso JA, Landero-Figueroa J. Separation of silver ions and starch modified silver nanoparticles using high performance liquid chromatography with ultraviolet and inductively coupled mass spectrometric detection. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2014;100:173-9.
23. Zhou X-X, Liu R, Liu J-F. Rapid chromatographic separation of dissoluble Ag(I) and silver-containing nanoparticles of 1–100 nanometer in antibacterial products and environmental waters. *Environ Sci Technol*. 2014;48(24):14516-24.
24. Soto-Alvaredo J, Montes-Bayon M, Bettmer J. Speciation of Silver Nanoparticles and Silver(I) by Reversed-Phase Liquid Chromatography Coupled to ICPMS. *Anal Chem*. 2013;85(3):1316-21.
25. Sánchez-García L, Bolea E, Laborda F, Cubel C, Ferrer P, Gianolio D, et al. Size determination and quantification of engineered cerium oxide nanoparticles by flow field-flow

fractionation coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2016;1438:205-15.

26. Marassi V, Casolari S, Roda B, Zattoni A, Reschiglian P, Panzavolta S, et al. Hollow-fiber flow field-flow fractionation and multi-angle light scattering investigation of the size, shape and metal-release of silver nanoparticles in aqueous medium for nano-risk assessment. *J Pharmaceut Biomed*. 2015;106:92-9.

27. Bolea E, Jimenez-Lamana J, Laborda F, Castillo JR. Size characterization and quantification of silver nanoparticles by asymmetric flow field-flow fractionation coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2011;401(9):2723-32.

28. da Silva BF, Perez S, Gardinalli P, Singhal RK, Mozeto AA, Barcelo D. Analytical chemistry of metallic nanoparticles in natural environments. *Trac-Trend Anal Chem*. 2011;30(3):528-40.

29. von der Kammer F, Legros S, Larsen EH, Loeschner K, Hofmann T. Separation and characterization of nanoparticles in complex food and environmental samples by field-flow fractionation. *Trac-Trend Anal Chem*. 2011;30(3):425-36.

30. Vega FA, Weng LP. Speciation of heavy metals in River Rhine. *Water Research*. 2013;47(1):363-72.

31. von der Kammer F, Ferguson PL, Holden PA, Masion A, Rogers KR, Klaine SJ, et al. Analysis of engineered nanomaterials in complex matrices (environment and biota): General considerations and conceptual case studies. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2012;31(1):32-49.

32. Lead JR, Wilkinson KJ. Aquatic colloids and nanoparticles: Current knowledge and future trends. *Environmental Chemistry*. 2006;3(3):159-71.

33. Dubascoux S, Le Hecho I, Hassellöv M, Von der Kammer F, Gautier MP, Lespes G. Field-flow fractionation and inductively coupled plasma mass spectrometer coupling: History, development and applications. *J Anal Atom Spectrom*. 2010;25(5):613-23.

34. Helfrich A, Bettmer J. Analysis of gold nanoparticles using ICP-MS-based hyphenated and complementary ESI-MS techniques. *Int J Mass Spectrom*. 2011;307(1-3):92-8.

35. Helfrich A, Bruchert W, Bettmer J. Size characterisation of Au nanoparticles by ICP-MS coupling techniques. *J Anal Atom Spectrom*. 2006;21(4):431-4.

36. Degueldre C, Favarger PY, Wold S. Gold colloid analysis by inductively coupled plasma-mass spectrometry in a single particle mode. *Anal Chim Acta*. 2006;555(2):263-8.

37. Pace HE, Rogers NJ, Jarolimek C, Coleman VA, Gray EP, Higgins CP, et al. Single Particle Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry: A Performance Evaluation and Method Comparison in the Determination of Nanoparticle Size. *Environmental Science & Technology*. 2012;46(22):12272-80.



38. Wagner S, Gondikas A, Neubauer E, Hofmann T, von der Kammer F. Spot the difference: engineered and natural nanoparticles in the environment – release, behavior, and fate. *Angew Chem Int Edit*. 2014;53(46):12398-419.
39. Baalousha M. Aggregation and disaggregation of iron oxide nanoparticles: Influence of particle concentration, pH and natural organic matter. *Science of the Total Environment*. 2009;407(6):2093-101.
40. Baalousha M, Nur Y, Römer I, Tejamaya M, Lead JR. Effect of monovalent and divalent cations, anions and fulvic acid on aggregation of citrate-coated silver nanoparticles. *Science of the Total Environment*. 2013;454:119-31.
41. Grillo R, Rosa AH, Fraceto LF. Engineered nanoparticles and organic matter: a review of the state-of-the-art. *Chemosphere*. 2015;119:608-19.
42. Philippe A, Schaumann GE. Interactions of dissolved organic matter with natural and engineered inorganic colloids: a review. *Environ Sci Technol*. 2014;48(16):8946-62.
43. Chinnapongse SL, MacCuspie RI, Hackley VA. Persistence of singly dispersed silver nanoparticles in natural freshwaters, synthetic seawater, and simulated estuarine waters. *Science of the Total Environment*. 2011;409(12):2443-50.
44. Adegboyega NF, Sharma VK, Siskova K, Zboril R, Sohn M, Schultz BJ, et al. Interactions of Aqueous Ag<sup>+</sup> with Fulvic Acids: Mechanisms of Silver Nanoparticle Formation and Investigation of Stability. *Environmental Science & Technology*. 2013;47(2):757-64.
45. Cumberland SA, Lead JR. Particle size distributions of silver nanoparticles at environmentally relevant conditions. *J Chromatogr A*. 2009;1216(52):9099-105.
46. Delay M, Dolt T, Woellhaf A, Sembritzki R, Frimmel FH. Interactions and stability of silver nanoparticles in the aqueous phase: Influence of natural organic matter (NOM) and ionic strength. *J Chromatogr A*. 2011;1218(27):4206-12.
47. Kuhn M, Ivleva NP, Klitzke S, Niessner R, Baumann T. Investigation of coatings of natural organic matter on silver nanoparticles under environmentally relevant conditions by surface-enhanced Raman scattering. *Sci Total Environ*. 2015;535:122-30.
48. Akaighe N, MacCuspie RI, Navarro DA, Aga DS, Banerjee S, Sohn M, et al. Humic Acid-Induced Silver Nanoparticle Formation Under Environmentally Relevant Conditions. *Environmental Science & Technology*. 2011;45(9):3895-901.
49. Litvin VA, Galagan RL, Minaev BF. Kinetic and mechanism formation of silver nanoparticles coated by synthetic humic substances. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*. 2012;414:234-43.
50. Baalousha M, Lead JR. Size fractionation and characterization of natural aquatic colloids and nanoparticles. *Science of the Total Environment*. 2007;386(1-3):93-102.

51. Domingos RF, Baalousha MA, Ju-Nam Y, Reid MM, Tufenkji N, Lead JR, et al. Characterizing Manufactured Nanoparticles in the Environment: Multimethod Determination of Particle Sizes. *Environmental Science & Technology*. 2009;43(19):7277-84.
52. Gigault J, Hackley VA. Differentiation and characterization of isotopically modified silver nanoparticles in aqueous media using asymmetric-flow field flow fractionation coupled to optical detection and mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. 2013;763:57-66.
53. Chu B. *Laser light scattering 2e: basic principles and practice*. San Diego: Academic Press; 2012.
54. Atkins PW, de Paula J, Bär M, Schleitzer A, Heinisch C. *Physikalische Chemie*. 4th ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2006.
55. Malvern Instruments. *How is the distribution calculated in dynamic light scattering? Manual*. 2007.
56. Dörfler HD. *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme: Physik und Chemie*. Berlin Heidelberg: Springer; 2002.
57. Schramm LL. *Emulsions, foams, suspensions, and aerosols: microscience and applications*. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2014.
58. Cammann K. *Instrumentelle Analytische Chemie: Verfahren, Anwendungen, Qualitätssicherung*. Heidelberg Berlin: Spektrum Akademischer Verlag; 2001.
59. Rejeski, D. *Nanotechnology and consumer products: Hearing before the Consumer Product Safety Commission*(18 August 2009).
60. Blaser SA, Scheringer M, MacLeod M, Hungerbühler K. Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: Contribution of nano-functionalized plastics and textiles. *Science of the Total Environment*. 2008;390(2-3):396-409.
61. Mueller NC, Nowack B. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environmental Science & Technology*. 2008;42(12):4447-53.
62. Hajipour MJ, Fromm KM, Ashkarran AA, de Aberasturi DJ, de Larramendi IR, Rojo T, et al. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*. 2012;30(10):499-511.
63. Smetana AB, Klabunde KJ, Marchin GR, Sorensen CM. Biocidal activity of nanocrystalline silver powders and particles. *Langmuir*. 2008;24(14):7457-64. Epub 2008/06/12.
64. Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine*. 2007;3(1):95-101. Epub 2007/03/24.
65. Hwang ET, Lee JH, Chae YJ, Kim YS, Kim BC, Sang BI, et al. Analysis of the toxic mode of action of silver nanoparticles using stress-specific bioluminescent bacteria. *Small*. 2008;4(6):746-50. Epub 2008/06/06.

66. Marambio-Jones C, Hoek EMV. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research*. 2010;12(5):1531-51.
67. Kumar R, Howdle S, Münstedt H. Polyamide/silver antimicrobials: Effect of filler types on the silver ion release. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials*. 2005;75B(2):311-9.
68. Han DW, Lee MS, Lee MH, Uzawa M, Park JC. The use of silver-coated ceramic beads for sterilization of *Sphingomonas* sp in drinking mineral water. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2005;21(6-7):921-4.
69. Navarro E, Piccapietra F, Wagner B, Marconi F, Kaegi R, Odzak N, et al. Toxicity of Silver Nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science & Technology*. 2008;42(23):8959-64.
70. Liu JY, Hurt RH. Ion Release Kinetics and Particle Persistence in Aqueous Nano-Silver Colloids. *Environmental Science & Technology*. 2010;44(6):2169-75.
71. Choi O, Deng KK, Kim NJ, Ross L, Surampalli RY, Hu ZQ. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Research*. 2008;42(12):3066-74.
72. Ratte HT. Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: A review. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 1999;18(1):89-108.
73. Li X, Lenhart JJ. Aggregation and Dissolution of Silver Nanoparticles in Natural Surface Water. *Environmental Science & Technology*. 2012;46(10):5378-86.
74. Jang H, Kim S-K, Kim S-J. Effect of Particle Size and Phase Composition of Titanium Dioxide Nanoparticles on the Photocatalytic Properties. *Journal of Nanoparticle Research*. 2001;3(2-3):141-7.
75. Limbach LK, Li YC, Grass RN, Brunner TJ, Hintermann MA, Muller M, et al. Oxide nanoparticle uptake in human lung fibroblasts: Effects of particle size, agglomeration, and diffusion at low concentrations. *Environmental Science & Technology*. 2005;39(23):9370-6.
76. Franklin NM, Rogers NJ, Apte SC, Batley GE, Gadd GE, Casey PS. Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl<sub>2</sub> to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): The importance of particle solubility. *Environmental Science & Technology*. 2007;41(24):8484-90.
77. Clift MJD, Rothen-Rutishauser B, Brown DM, Duffin R, Donaldson K, Proudfoot L, et al. The impact of different nanoparticle surface chemistry and size on uptake and toxicity in a murine macrophage cell line. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2008;232(3):418-27.

78. Pace HE, Leshner EK, Ranville JF. Influence of Stability on the Acute Toxicity of Cdse/Zns Nanocrystals to *Daphnia Magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2010;29(6):1338-44.
79. Pace HE, Rogers NJ, Jarolimek C, Coleman VA, Higgins CP, Ranville JF. Determining Transport Efficiency for the Purpose of Counting and Sizing Nanoparticles via Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal Chem*. 2011;83(24):9361-9.
80. Kaegi R, Sinnet B, Zuleeg S, Hagendorfer H, Mueller E, Vonbank R, et al. Release of silver nanoparticles from outdoor facades. *Environmental Pollution*. 2010;158(9):2900-5.
81. Gottschalk F, Nowack B. The release of engineered nanomaterials to the environment. *Journal of Environmental Monitoring*. 2011;13(5):1145-55.
82. Radheshkumar C, Münstedt H. Antimicrobial polymers from polypropylene/silver composites-Ag<sup>+</sup> release measured by anode stripping voltammetry. *Reactive & Functional Polymers*. 2006;66(7):780-8.
83. Benn TM, Westerhoff P. Nanoparticle Silver Released into Water from Commercially Available Sock Fabrics. *Environmental Science & Technology*. 2008;42(11):4133-9.
84. Geranio L, Heuberger M, Nowack B. The Behavior of Silver Nanotextiles during Washing. *Environmental Science & Technology*. 2009;43(21):8113-8.
85. Marini M, De Niederhausern S, Iseppi R, Bondi M, Sabia C, Toselli M, et al. Antibacterial activity of plastics coated with silver-doped organic-inorganic hybrid coatings prepared by sol-gel processes. *Biomacromolecules*. 2007;8(4):1246-54.
86. Bone AJ, Colman BP, Gondikas AP, Newton KM, Harrold KH, Cory RM, et al. Biotic and Abiotic Interactions in Aquatic Microcosms Determine Fate and Toxicity of Ag Nanoparticles: Part 2–Toxicity and Ag Speciation. *Environmental Science & Technology*. 2012;46(13):6925-33.
87. Hoque ME, Khosravi K, Newman K, Metcalfe CD. Detection and characterization of silver nanoparticles in aqueous matrices using asymmetric-flow field flow fractionation with inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2012;1233:109-15.
88. Gühlke M, Heiner Z, Kneipp J. Surface-enhanced Raman and surface-enhanced hyper-Raman scattering of thiol-functionalized carotene. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2016.
89. Tani T. Silver nanoparticles: from silver halide photography to plasmonics. Oxford: Oxford University Press; 2015.
90. Ledwith DM, Aherne D, Kelly JM. Approaches to the synthesis and characterization of spherical and anisotropic silver nanomaterials. In: Kumar CSSR, editor. *Metallic Nanomaterials*. Weinheim: Wiley-VCH; 2009. p. 99-148.
91. Tan KH. *Environmental soil science*. New York: Marcel Dekker; 1994.

92. Bahadir M, Töpfer K, Parlar H, Spittler M. Springer Umweltlexikon. Berlin Heidelberg: Springer; 2013.
93. Koß V. Umweltchemie: eine Einführung für Studium und Praxis. Berlin Heidelberg: Springer; 2013.
94. Giddings JC. A new separation concept based on a coupling of concentration and flow nonuniformities. *Separation Science*. 1966;1(1):123-5.
95. Schimpf ME, Caldwell K, Giddings JC. Field-flow fractionation handbook. New York: Wiley; 2000.
96. Wahlund KG, Giddings JC. Properties of an asymmetrical flow field-flow fractionation channel having one permeable wall. *Anal Chem*. 1987;59(9):1332-9.
97. Messaud FA, Sanderson RD, Runyon JR, Otte T, Pasch H, Williams SKR. An overview on field-flow fractionation techniques and their applications in the separation and characterization of polymers. *Progress in Polymer Science*. 2009;34(4):351-68.
98. Mes EP, de Jonge H, Klein T, Welz RR, Gillespie DT. Characterization of high molecular weight polyethylenes using high temperature asymmetrical flow field-flow fractionation with on-line infrared, light scattering, and viscometry detection. *J Chromatogr A*. 2007;1154(1-2):319-30. Epub 2007/04/20.
99. Roda B, Zattoni A, Reschiglian P, Moon MH, Mirasoli M, Michelini E, et al. Field-flow fractionation in bioanalysis: A review of recent trends. *Anal Chim Acta*. 2009;635(2):132-43.
100. Gabrielson JP, Brader ML, Pekar AH, Mathis KB, Winter G, Carpenter JF, et al. Quantitation of aggregate levels in a recombinant humanized monoclonal antibody formulation by size-exclusion chromatography, asymmetrical flow field flow fractionation, and sedimentation velocity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007;96(2):268-79.
101. Hawe A, Romeijn S, Filipe V, Jiskoot W. Asymmetrical flow field-flow fractionation method for the analysis of submicron protein aggregates. *J Pharm Sci*. 2012;101(11):4129-39. Epub 2012/08/23.
102. Baalousha M, Stolpe B, Lead JR. Flow field-flow fractionation for the analysis and characterization of natural colloids and manufactured nanoparticles in environmental systems: A critical review. *J Chromatogr A*. 2011;1218(27):4078-103.
103. Lohrke J, Briel A, Mäder K. Characterization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles by asymmetrical flow-field-flow-fractionation. *Nanomedicine*. 2008;3(4):437-52.
104. Wahlund K-G, Nilsson L. Flow FFF – basics and key applications. In: Williams SKR, Caldwell KD, editors. *Field-flow fractionation in biopolymer analysis*. Wien: Springer; 2011. p. 1-22.

105. Kuklenyik Z, Gardner M, Parks B, Schieltz D, Rees J, McWilliams L, et al. Multivariate DoE optimization of asymmetric flow field flow fractionation coupled to quantitative LC-MS/MS for analysis of lipoprotein subclasses. *Chromatography*. 2015;2(1):96.
106. Prestel H, Niessner R, Panne U. Increasing the sensitivity of asymmetrical flow field-flow fractionation: Slot outlet technique. *Anal Chem*. 2006;78(18):6664-9.
107. Lee HL, Reis JFG, Dohner J, Lightfoot EN. Single-phase chromatography – solute retardation by ultrafiltration and electrophoresis. *Aiche J*. 1974;20(4):776-84.
108. Jonsson JA, Carlshaf A. Flow Field Flow Fractionation in Hollow Cylindrical Fibers. *Anal Chem*. 1989;61(1):11-8.
109. Reschiglian P, Zattoni A, Roda B, Rambaldi DC, Moon MH. Hollow-fiber flow field-flow fractionation: a pipeline to scale down separation and enhance detection of proteins and cells. In: Williams SKR, Caldwell KD, editors. *Field-flow fractionation in biopolymer analysis*. Wien: Springer; 2011. p. 37-56.
110. Carlshaf A, Jonsson JA. Gradient Elution in Hollow-Fibre Flow Field-Flow Fractionation. *Journal of Chromatography*. 1989;461:89-93.
111. Wijnhoven JEGJ, Koorn JP, Poppe H, Kok WT. Hollow-fiber flow field-flow fractionation of polystyrene sulfonates. *J Chromatogr A*. 1995;699(1-2):119-29.
112. Lee WJ, Min BR, Moon MH. Improvement in particle separation by hollow fiber flow field-flow fractionation and the potential use in obtaining particle size distribution. *Anal Chem*. 1999;71(16):3446-52.
113. van Bruijnsvoort M, Kok WT, Tijssen R. Hollow-fiber flow field-flow fractionation of synthetic polymers in organic solvents. *Anal Chem*. 2001;73(19):4736-42.
114. Johann C, Elsenberg S, Roesch U, Rambaldi DC, Zattoni A, Reschiglian P. A novel approach to improve operation and performance in flow field-flow fractionation. *J Chromatogr A*. 2011;1218(27):4126-31.
115. Reschiglian P, Roda B, Zattoni A, Tanase M, Marassi V, Serani S. Hollow-fiber flow field-flow fractionation with multi-angle laser scattering detection for aggregation studies of therapeutic proteins. *Anal Bioanal Chem*. 2014;406(6):1619-27.
116. Wijnhoven JEGJ, Koorn JP, Poppe H, Kok WT. Influence of injected mass and ionic strength on retention of water-soluble polymers and proteins in hollow-fibre flow field-flow fractionation. *J Chromatogr A*. 1996;732(2):307-15.
117. Tan ZQ, Liu JF, Guo XR, Yin YG, Byeon SK, Moon MH, et al. Toward full spectrum speciation of silver nanoparticles and ionic silver by on-line coupling of hollow fiber flow field-flow fractionation and minicolumn concentration with multiple detectors. *Anal Chem*. 2015;87(16):8441-7.

118. Saenmuangchin R, Mettakoonpitak J, Shiowatana J, Siripinyanond A. Separation of silver nanoparticles by hollow fiber flow field-flow fractionation: addition of tannic acid into carrier liquid as a modifier. *J Chromatogr A*. 2015;1415:115-22.
119. Mori S, Barth HG. Size exclusion chromatography. Berlin: Springer Verlag; 1999.
120. Unger KK. Handbuch der HPLC, Teil 1 – Leitfaden für Anfänger und Praktiker. Darmstadt: GIT Verlag; 1989.
121. Otto M. Analytische Chemie. Weinheim: Wiley-VCH; 2011.
122. Gross JH, Beifuss K. Massenspektrometrie: ein Lehrbuch. Berlin Heidelberg: Springer; 2013.
123. Vanhaecke F, Degryse P. Isotopic analysis: fundamentals and applications using ICP-MS. Weinheim: Wiley-VCH; 2012.
124. Griem HR. Plasma spectroscopy. New York: McGraw-Hill; 1964.
125. Thomas R. Practical guide to ICP-MS: a tutorial for beginners. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 2008.
126. Montaser A. Inductively coupled plasma mass spectrometry. New York: Wiley-VCH; 1998.
127. Thomas R. Practical guide to ICP-MS: a tutorial for beginners. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press; 2013.
128. Gray AL. Solid sample introduction by laser ablation for inductively coupled plasma source-mass spectrometry. *Analyst*. 1985;110(5):551-6.
129. Howe T, Shkolnik J, Thomas R. A solid sampling tool finally reaches maturity – what drove the development of laser ablation sample introduction for atomic spectroscopy? *Spectroscopy*. 2001;16(2):54.
130. Becker S. Inorganic mass spectrometry: principles and applications. Chichester: Wiley; 2008.
131. Degueldre C, Favarger PY. Colloid analysis by single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry: a feasibility study. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*. 2003;217(1-3):137-42.
132. Laborda F, Jimenez-Lamana J, Bolea E, Castillo JR. Critical considerations for the determination of nanoparticle number concentrations, size and number size distributions by single particle ICP-MS. *J Anal Atom Spectrom*. 2013;28(8):1220-32.
133. Peters R, Herrera-Rivera Z, Undas A, van der Lee M, Marvin H, Bouwmeester H, et al. Single particle ICP-MS combined with a data evaluation tool as a routine technique for the analysis of nanoparticles in complex matrices. *J Anal Atom Spectrom*. 2015;30(6):1274-85.
134. Sötebier CA, Kutscher DJ, Rottmann L, Jakubowski N, Panne U, Bettmer J. Combination of single particle ICP-QMS and isotope dilution analysis for the determination of size, particle

number and number size distribution of silver nanoparticles. *J Anal At Spectrom.* 2016;31(10):2045-52.

135. Gschwind S, Hagendorfer H, Frick DA, Gunther D. Mass Quantification of Nanoparticles by Single Droplet Calibration Using Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal Chem.* 2013;85(12):5875-83.

136. Powers CM, Slotkin TA, Seidler FJ, Badireddy AR, Padilla S. Silver nanoparticles alter zebrafish development and larval behavior: distinct roles for particle size, coating and composition. *Neurotoxicology and Teratology.* 2011;33(6):708-14.

137. Reed RB, Higgins CP, Westerhoff P, Tadjiki S, Ranville JF. Overcoming challenges in analysis of polydisperse metal-containing nanoparticles by single particle inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Anal Atom Spectrom.* 2012;27(7):1093-100.

138. Harris DC, Werner G, Werner T. *Lehrbuch der Quantitativen Analyse.* Berlin Heidelberg: Springer; 2014.

139. Rottmann L, Heumann K. Development of an on-line isotope dilution technique with HPLC/ICP-MS for the accurate determination of elemental species. *Fresenius' journal of analytical chemistry.* 1994;350(4-5):221-7.

140. Heumann KG. Isotope dilution mass spectrometry. In: Adams F, Gijbels R, Van Grieken R, editors. *Inorganic mass spectrometry.* New York: Wiley; 1988. p. 301-76.

141. Rodriguez-Gonzalez P, Marchante-Gayon JM, Alonso JIG, Sanz-Medel A. Isotope dilution analysis for elemental speciation: a tutorial review. *Spectrochim Acta B.* 2005;60(2):151-207.

142. Rottmann L, Heumann KG. Determination of Heavy-Metal Interactions with Dissolved Organic Materials in Natural Aquatic Systems by Coupling a High-Performance Liquid-Chromatography System with an Inductively-Coupled Plasma-Mass Spectrometer. *Anal Chem.* 1994;66(21):3709-15.

143. Sötebier CA, Weidner SM, Jakubowski N, Bettmer J. Separation and quantification of silver nanoparticles and silver ions using reversed phase high performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry in combination with isotope dilution analysis. *J Chromatogr A.* 2016;1468:102-8.

144. Moreno-Gordaliza E, Esteban-Fernandez D, Giesen C, Lehmann K, Lazaro A, Tejedor A, et al. LA-ICP-MS and nHPLC-ESI-LTQ-FT-MS/MS for the analysis of cisplatin-protein complexes separated by two dimensional gel electrophoresis in biological samples. *J Anal Atom Spectrom.* 2012;27(9):1474-83.

145. Fabricius A-L, Duester L, Meermann B, Ternes T. ICP-MS-based characterization of inorganic nanoparticles—sample preparation and off-line fractionation strategies. *Anal Bioanal Chem.* 2014;406(2):467-79.



146. Kromidas S. The HPLC expert: possibilities and limitations of modern high performance liquid chromatography. Weinheim: Wiley-VCH; 2016.
147. Prichard E, Barwick V. Quality Assurance in Analytical Chemistry. Chichester: Wiley; 2007.
148. Agnihotri S, Mukherji S, Mukherji S. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5-100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. RSC Adv. 2014;4(8):3974-83.
149. Schädlich A, Rose C, Kuntsche J, Caysa H, Mueller T, Göpferich A, et al. How Stealthy are PEG-PLA Nanoparticles? An NIR In Vivo Study Combined with Detailed Size Measurements. Pharmaceutical Research. 2011;28(8):1995-2007.
150. Meermann B, Fabricius AL, Duester L, Vanhaecke F, Ternes T. Fraction-related quantification of silver nanoparticles via on-line species-unspecific post-channel isotope dilution in combination with asymmetric flow-field-flow fractionation (AF4)/sector field ICP-mass spectrometry (ICP-SF-MS). J Anal Atom Spectrom. 2014;29(2):287-96.
151. Mitrano DM, Barber A, Bednar A, Westerhoff P, Higgins CP, Ranville JF. Silver nanoparticle characterization using single particle ICP-MS (SP-ICP-MS) and asymmetrical flow field flow fractionation ICP-MS (AF4-ICP-MS). J Anal Atom Spectrom. 2012;27(7):1131-42.
152. Poda AR, Bednar AJ, Kennedy AJ, Harmon A, Hull M, Mitrano DM, et al. Characterization of silver nanoparticles using flow-field flow fractionation interfaced to inductively coupled plasma mass spectrometry. J Chromatogr A. 2011;1218(27):4219-25.
153. Bendixen N, Losert S, Adlhart C, Lattuada M, Ulrich A. Membrane-particle interactions in an asymmetric flow field flow fractionation channel studied with titanium dioxide nanoparticles. J Chromatogr A. 2014;1334(0):92-100.
154. Schaefer HE. Nanoscience: the science of the small in physics, engineering, chemistry, biology and medicine. Berlin Heidelberg: Springer; 2010.
155. Qureshi RN, Kok WT. Optimization of asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4). LC GC Europe. 2010;23(1):18-25.
156. Dubascoux S, Von Der Kammer F, Le Hécho I, Gautier MP, Lespes G. Optimisation of asymmetrical flow field flow fractionation for environmental nanoparticles separation. J Chromatogr A. 2008;1206(2):160-5.
157. Ulrich A, Losert S, Bendixen N, Al-Kattan A, Hagendorfer H, Nowack B, et al. Critical aspects of sample handling for direct nanoparticle analysis and analytical challenges using asymmetric field flow fractionation in a multi-detector approach. J Anal Atom Spectrom. 2012;27(7):1120-30.
158. Hagendorfer H, Kaegi R, Parlinska M, Sinnet B, Ludwig C, Ulrich A. Characterization of Silver Nanoparticle Products Using Asymmetric Flow Field Flow Fractionation with a

Multidetector Approach - a Comparison to Transmission Electron Microscopy and Batch Dynamic Light Scattering. *Anal Chem.* 2012;84(6):2678-85.

159. Prestel H, Schott L, Niessner R, Panne U. Characterization of sewage plant hydrocolloids using asymmetrical flow field-flow fractionation and ICP-mass spectrometry. *Water Research.* 2005;39(15):3541-52.

160. Hagendorfer H, Kaegi R, Traber J, Mertens SFL, Scherrers R, Ludwig C, et al. Application of an asymmetric flow field flow fractionation multi-detector approach for metallic engineered nanoparticle characterization - Prospects and limitations demonstrated on Au nanoparticles. *Anal Chim Acta.* 2011;706(2):367-78.

161. Bouby M, Geckeis H, Manh TN, Yun JI, Dardenne K, Schafer T, et al. Laser-induced breakdown detection combined with asymmetrical flow field-flow fractionation: application to iron oxo/hydroxide colloid characterization. *J Chromatogr A.* 2004;1040(1):97-104.

162. Nightingale A. Background noise in electromyography. *Phys Med Biol.* 1959;3(4):325-38.

163. Montano MD, Badiei HR, Bazargan S, Ranville JF. Improvements in the detection and characterization of engineered nanoparticles using spICP-MS with microsecond dwell times. *Environmental Science: Nano.* 2014;1(4):338-46.

164. Borovinskaya O, Hattendorf B, Tanner M, Gschwind S, Günther D. A prototype of a new inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometer providing temporally resolved, multi-element detection of short signals generated by single particles and droplets. *J Anal Atom Spectrom.* 2013;28(2):226-33.

165. Borovinskaya O, Gschwind S, Hattendorf B, Tanner M, Günther D. Simultaneous mass quantification of nanoparticles of different composition in a mixture by microdroplet generator-ICPTOFMS. *Anal Chem.* 2014;86(16):8142-8.

166. Olesik JW, Gray PJ. Considerations for measurement of individual nanoparticles or microparticles by ICP-MS: determination of the number of particles and the analyte mass in each particle. *J Anal Atom Spectrom.* 2012;27(7):1143-55.

167. Telgmann L, Metcalfe CD, Hintelmann H. Rapid size characterization of silver nanoparticles by single particle ICP-MS and isotope dilution. *J Anal Atom Spectrom.* 2014;29(7):1265-72.

168. Goodall P, Foulkes ME, Ebdon L. Slurry nebulization inductively-coupled plasma spectrometry – the fundamental parameters discussed. *Spectrochim Acta B.* 1993;48(13):1563-77.

169. O'Hanlon K, Ebdon L, Foulkes M. Effect of easily ionisable elements on the mass transport efficiency of solutions and slurries used in plasma emission spectrometry. *J Anal Atom Spectrom.* 1997;12(3):329-31.

170. Ramkorun-Schmidt B, Pergantis SA, Esteban-Fernández D, Jakubowski N, Günther D. Investigation of a combined microdroplet generator and pneumatic nebulization system for quantitative determination of metal-containing nanoparticles using ICPMS. *Anal Chem.* 2015;87(17):8687-94.
171. Franze B, Engelhard C. Fast Separation, Characterization, and Speciation of Gold and Silver Nanoparticles and Their Ionic Counterparts with Micellar Electrokinetic Chromatography Coupled to ICP-MS. *Anal Chem.* 2014;86(12):5713-20.
172. Bulavchenko AI, Popovetsky PS. Electrokinetic potential of nanoparticles in reverse AOT micelles: photometric determination and role in the processes of heterocoagulation, separation, and concentration. *Langmuir.* 2010;26(2):736-42.
173. Bolea E, Gorriz MP, Bouby M, Laborda F, Castillo JR, Geckeis H. Multielement characterization of metal-humic substances complexation by size exclusion chromatography, asymmetrical flow field-flow fractionation, ultrafiltration and inductively coupled plasma-mass spectrometry detection: A comparative approach. *J Chromatogr A.* 2006;1129(2):236-46.
174. Amarasiriwardena D, Siripinyanond A, Barnes RM. Trace elemental distribution in soil and compost-derived humic acid molecular fractions and colloidal organic matter in municipal wastewater by flow field-flow fractionation-inductively coupled plasma mass spectrometry (flow FFF-ICP-MS). *J Anal Atom Spectrom.* 2001;16(9):978-86.
175. Vogl J, Heumann KG. Determination of heavy metal complexes with humic substances by HPLC/ICP-MS coupling using on-line isotope dilution technique. *Fresen J Anal Chem.* 1997;359(4-5):438-41.
176. Wang N, Li B, Qiao F, Sun J, Fan H, Ai S. Humic acid-assisted synthesis of stable copper nanoparticles as a peroxidase mimetic and their application in glucose detection. *J Mater Chem B.* 2015;3(39):7718-23.
177. Dubas ST, Pimpan V. Humic acid assisted synthesis of silver nanoparticles and its application to herbicide detection. *Mater Lett.* 2008;62(17-18):2661-3.

## 8 Publikationsverzeichnis

Im Rahmen dieser Arbeit sind die folgenden Publikationen, Vorträge und Posterbeiträge entstanden.

### Veröffentlichungen

1. Sötebier CA, Weidner SM, Jakubowski N, Bettmer J. Separation and quantification of silver nanoparticles and silver ions using reversed phase high performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry in combination with isotope dilution analysis. J Chromatogr A. 2016;1468:102-8.
2. Sötebier CA, Kutscher DJ, Rottmann L, Jakubowski N, Panne U, Bettmer J. Combination of single particle ICP-QMS and isotope dilution analysis for the determination of size, particle number and number size distribution of silver nanoparticles. J Anal At Spectrom. 2016;31(10):2045-52.
3. Sötebier CA, Bierkandt FS, Rades S, Jakubowski N, Panne U, Weidner SM. Sample loss in asymmetric flow field-flow fractionation coupled to inductively coupled plasma-mass spectrometry of silver nanoparticles. J Anal Atom Spectrom. 2015;30(10):2214-22.

### Vorträge

1. Characterization of silver nanoparticles: Limitation and advantages of field-flow fractionation, 18th International Symposium on Field- and Flow-Based Separations, Dresden, 22.-26.05.2016.
2. Application of ICP-MS in the single particle mode and isotope dilution analysis on the example of silver nanoparticles, Anwendertreffen Plasmaspektrometrie 2016, Berlin, 22.02.2016.
3. Analysis of Silver Nanoparticles Using AF4 Coupled to ICP-MS: Investigating Sample Loss and Recovery Rates, 3rd Workshop on Field-Flow Fractionation-Mass Spectrometry, Wien, Österreich, 05.09.2015.
4. Characterization of silver nanoparticles using asymmetric-flow field-flow fractionation combined with inductively coupled plasma mass spectrometry, Anwendertreffen Plasmaspektrometrie 2014, Hamburg, 11.02.2014.

**Posterbeiträge**

1. Analysis of Silver Nanoparticles Using AF4 Coupled to ICP-MS: Investigating Sample Loss and Recovery Rates, 10<sup>th</sup> International Conference on the Environmental Effects of Nanoparticles and Nanomaterials, Wien, Österreich, 06.-09.09.2015.
2. Kopplung der Asymmetrischen Fluss-Feld-Fluss Fraktionierung mit der ICP-MS zu Analyse von Ag Nanopartikeln, 24. ICP-MS Anwendertreffen 2014, Geesthacht, 15.-18.09.2015.
3. Characterization of Silver Nanoparticles Using Asymmetric-Flow Field-Flow Fractionation Combined with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, 16<sup>th</sup> International Symposium on Field and Flow-Based Separations, Pau, Frankreich, 30.06.-04.07.2013.

## 9 **Selbstständigkeitserklärung**

Ich erkläre, dass ich die Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der von mir gemäß § 7 Abs. 3 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, veröffentlicht im Amtlichen Mitteilungsblatt der Humboldt-Universität zu Berlin Nr. 126/2014 am 18.11.2014, angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, 28.11.2016

Carina Anna Sötebier